

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, 1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ZDRAVOTNICKÁ TECHNIKA



**SOUČASNÉ METODICKÉ PŘÍSTUPY A APLIKACE TECHNOLOGIE
DNA ČIPŮ**

Current methodologies and applications of DNA chips

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Ing. Stanislav Kmoch, CSc.

Autor: Renata Hájková

2008

PROHLÁŠENÍ

Čestně prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně a prameny, ze kterých jsem čerpala, řádně cituji s uvedením plného odkazu na příslušný zdroj.

V Praze

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Stanislavu Kmochovi, CSc. za odborné vedení bakalářské práce a Mgr. Haně Hartmannové a Mgr. Lence Noskové za poskytování cenných rad při jejím zpracování.

SOUHRN

DNA čipy představují v dnešní době nový analytický nástroj v oblasti molekulární biologie a genetiky. Oproti klasickým diagnostickým metodám je hlavním přínosem technologie možnost detekovat velké množství specifických DNA sekvencí v jediném pokusu. Jejich prostřednictvím lze ve velmi krátkém čase paralelně kvantifikovat expresi desítky tisíc genů či analyzovat velké množství vzorků pro široké spektrum mutací v genech. To představuje obrovské zrychlení analýz a snížení jejich ekonomické nákladnosti. Pro tyto schopnosti si DNA čipy našly široké uplatnění v genetickém inženýrství, farmakologii a zejména v medicíně. Kapacita a cena stávajících technologií vycházejících z desítek až stovek nanogramů DNA umožňuje provádění donedávna nepředstavitelných studií tisíců pacientů a kontrol.

Cílem této práce je přinést ucelený přehled o dané problematice, který je navíc doplněn o analýzu a srovnání základních přístupů a aplikací technologie DNA čipů.

SUMMARY

The DNA arrays are an innovative analytical tool in the present molecular biology and genetics. Compared to the traditional diagnostics methods the main advantage of this methodology is an ability to detect a multitude of specific DNA sequence within one experiment. The DNA array technology enables either concurrently quantify large number of transcripts or analyze vast bulk of samples for wide spectrum of gene mutations. Thanks to this technology a rapid decrease of its time-consuming and financial expenses was achieved.

High capacity and decreasing costs of the present DNA technologies enable to process thousands of medical and experimental studies, whose number was hardly achievable until recently.

Due to above mentioned qualities, DNA arrays are commonly used in gene engineering, pharmacology and above all in medicine.

The main goal of this essay is to process exhaustive overview about DNA arrays, which is in addition supplemented by the comparative analyses of the main methods and applications of the DNA array technology.

OBSAH

1. Úvod	6
2. Úvod do problematiky analýzy DNA	8
2.1 ZÁKLADNÍ POJMY	8
2.2 VYBRANÉ METODY ANALÝZY GENOMU	11
3. Princip čipové technologie	13
3.1 SLOŽENÍ DNA ČIPŮ	13
3.2 PŘÍPRAVA TESTOVANÉHO MATERIÁLU	17
3.3 POSTUP VYŠETŘENÍ VZORKU	22
4. Klasifikace čipů	26
4.1 ČIPY PRO GENOVOU EXPRESI	26
4.2 GENOTYPOVACÍ ČIPY	27
4.3 KOMPARATIVNÍ GENOMOVÁ HYBRIDIZACE (CGH)	28
4.4 TILING ARRAY	29
4.5 SROVNÁVACÍ GENOMOVÉ SEKVENOVÁNÍ (CGS)	30
4.5 CHROMATINOVÁ IMUNOPRECIPITACE NA ČIPU (CHIP-ON-CHIP)	30
4.6 ČIPY PRO IDENTIFIKACI METHYLACE DNA	30
5. Nejvýznamnější výrobci komerčně využívaných čipů	31
5.1 AFFYMETRIX	31
5.2 ILLUMINA	34
5.3 AGILENT TECHNOLOGIES	36
5.4 ROCHE NIMBLEGEN	39
6. Komparativní analýza	42
6.4 VARIABILITA VYUŽITÍ	42
6.1 CUSTOM ARRAYS	45
6.3 ONE COLOR X TWO COLOR	46
6.2 SPEKTRUM DOSTUPNÝCH ČIPŮ PRO JEDNOTLIVÉ ORGANISMY	47
7. Závěr	51
Zdroje	52
Přílohy	54

1. Úvod

Molekulární biologie a genetika je v současné době spojena s rozvojem technologií, které umožňují rychlejší a obsáhlejší testování DNA. Bezpochyby k tomu přispěl Human Genome Project, který přinesl velké množství nových poznatků o lidském genomu.

Klasické metody molekulární biologie jsou převážně zaměřeny na studium omezeného počtu genů v izolovaných podmínkách, avšak základním znakem většiny biologických a patologických procesů je jejich komplexnost a vzájemná interakce mezi jednotlivými genetickými faktory. Tyto vzájemné interakce hrají stále větší roli v porozumění celkovému molekulárnímu pozadí řady onemocnění a umožní hledání nových terapeutických přístupů. Čipové technologie usnadňují řešení těchto otázek, neboť umožňují simultánní testování tisíce genů v rámci jednoho vzorku.

Termín čip je spojován zejména s výpočetní technikou. Přenesením tohoto výrazu do molekulární biologie rozumíme pod pojmem „biočip“ uspořádání velkého počtu funkčních jednotek biologické povahy do jednoho celku. DNA čip nese na svém povrchu fragmenty DNA navržené ke genomu zkoumaného organismu.

V současné době jsou DNA čipy jednou z nejvíce se rozvíjejících metod molekulární genetiky. Jejich prostřednictvím je možné analyzovat velké množství vzorků pro široké spektrum mutací v genech, což představuje obrovské zrychlení analýz a snížení ekonomické nákladnosti.

Jsou efektivně využívány pro molekulárně genetickou diagnostiku dědičných onemocnění a vyhledávání a sledování včasných markerů onemocnění. Velkým přínosem jsou pro mikrobiologii, virologii a imunologii z hlediska usnadnění diagnostiky patogenů. Speciální uplatnění našly DNA čipy i v onkologii při určení správné diagnózy, typu nádoru, na jehož základě je možné nasadit efektivní léčbu s minimálními vedlejšími účinky. Velký význam mají čipy také ve farmakologii, protože představují možnost urychlení vývoje nových léčiv. Výhodou čipů je i obrovské snížení nákladů na vývoj léčebných preparátů a možnost produkce specifických léků pro malé skupiny pacientů.

DNA čipů a výrobních platforem DNA čipů je v současné době nepřeberné množství. Cílem této práce je přinést ucelený přehled o dané problematice, který je

navíc doplněn analýzou a srovnáním základních přístupů a aplikací technologie DNA čipů.

2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY ANALÝZY DNA

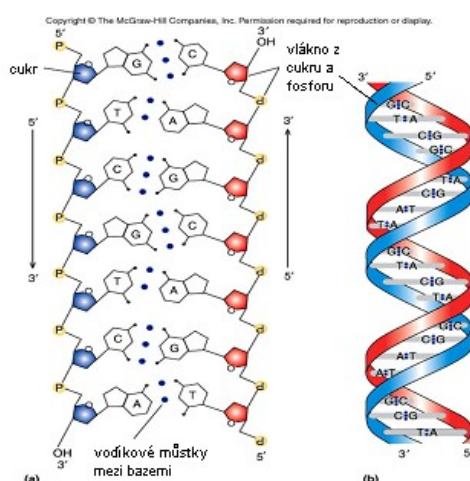
2.1 ZÁKLADNÍ POJMY

2.1.1 DNA

Každá buňka má v sobě uloženou kompletní informaci o vlastnostech organismu, ke kterému náleží. Umožňuje to deoxyribonukleová kyselina (DNA), ve které je prostřednictvím čtyř nukleotidových bazí zakódováno, co, kdy a jak mají buňky našeho těla dělat.

Strukturu DNA objevili v roce 1953 James Dewey Watson a Francis Compton Crick za výrazného přispění objevu rentgenové difrakce Rosalind Franklinové. Za velký přínos vědě v oblasti molekulární biologie dostali v roce 1962 Nobelovu cenu.

Molekula DNA se skládá ze tří typů stavebních kamenů. Vlákno tvoří střídavě zbytek kyseliny fosforečné s cukernou složkou 2-deoxy-D-ribosou a z něj vystupují nukleotidové baze: adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T). Dvě opačně orientovaná vlákna (jedno má směr fosfodiesterických vazeb $5' \rightarrow 3'$ a druhé $3' \rightarrow 5'$) pak k sobě přiléhají a pomocí vodíkových můstků mezi nukleotidy se spojují v útvar nazývaný dvoušroubovice. Vazba ovšem neprobíhá náhodně. Každý nukleotid na jednom vlákně má jednoznačně přiřazený nukleotid na vlákně protějším. To se děje na základě komplementarity bazí. Adenin tak vždy tvoří pár s thyminem, cytosin s guaninem. (Obrázek 1)[17]



Obrázek 1: Struktura DNA

(www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-p-008/prezentace.ppt) (upraveno autorem)

Genetická informace není uložena v jednotlivých bazích, ale v jejich pořadí (sekvenci) a kombinaci. Genem se nazývá úsek DNA se specifickou funkcí, který je schopen utvářet při dělení buňky svoje vlastní přesné kopie, které se přenáší do dalších generací.[14] Lidská DNA obsahuje asi 3 miliardy nukleotidů, které poskytují celkem 20 000 až 25 000 genů kódujících bílkoviny.

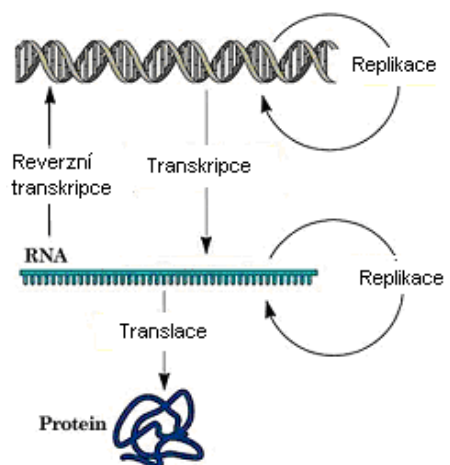
2.1.2 Centrální dogma buněčné biologie

Přenos a uchovávání genetické informace jsou realizovány replikací, přepisem DNA do DNA. Jedná se o proces, kdy nově vzniklá dvoušroubovice má vždy jedno vlákno původní a druhé nově nasyntetizované. Replikace se uplatňuje při rozmnožování, kdy zajišťuje identitu genetické informace obou dceřiných buněk.

Iniciace syntézy proteinu vyžaduje aktivaci určitého genu specifickým signálem přineseným ze vzdálených buněk organismu (např. hormonem), ze sousedních buněk (např. cytokiny) anebo z vlastní buňky. Příkaz převeze buď příslušný receptor na povrchu buněčné membrány anebo uvnitř buňky. Odtud je signál přenášen složitou cestou k transkripčnímu faktoru. Ten aktivuje příslušné místo - promotor, který spustí expresi genu.

Následuje přepis genetické informace do molekuly mRNA. Ta obsahuje místo deoxyribosy ribosu a v řetězci nukleotidových bazí je thymin (T) nahrazen uracilem (U). Transkribovaná mRNA je po posttranskripčních úpravách a translokaci z jádra používána k syntéze polypeptidového řetězce. Sled jednotlivých aminokyselin je určen trojicí (tripletem) bazí poskládanou z A, U, C, G. Triplet určující druh aminokyseliny se nazývá kodon.

Translace, vznik primární struktury bílkoviny podle mRNA, probíhá na polyribosomu, kde se na každém jednom místě přikládá jedna aminokyselina za druhou. Navazují posttranslační úpravy, které umožňují vytvářet varianty stejných proteinů – isoformy - s poněkud odlišnými vlastnostmi a funkcí. Takže genetická instrukce obsažená ve 20 000 – 25 000 genech může vytvořit až 500 000 různých proteinů.(Obrázek 2) [19]



Obrázek 2: Cesta přenosu genetické informace: DNA – RNA – protein

(www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-p-008/prezentace.ppt) (upraveno autorem)

2.1.3 Gen: jednotka dědičnosti

Objev dvojité šroubovice struktury molekuly DNA otevřel bránu pokusům o prozkoumání kódu, který je v ní uložen. Dnes, více než půl století po tomto objevu, byl tento kód prakticky rozluštěn, ačkoli mnohým jeho elementům ještě správně nerozumíme.¹

Na základě analýzy genomu byla rozpoznána řada genů, jejichž porucha (změněná struktura) způsobuje různá onemocnění. Mutovaný gen může kódovat bílkovinu, která není funkční, nebo k syntéze bílkoviny pod vlivem mutace nemusí docházet. Existuje řada nemocí, u kterých se předpokládá genetická podstata, ale konkrétní mutovaný gen nebyl odhalen. Znalost celého genomu umožní a urychlí identifikaci těchto neznámých genů. Velký přínos má zejména při studiu tzv. multigenních nemocí, nemocí způsobených poškozenou funkcí několika genů. Jakmile známe gen nebo geny spojené s nemocí, můžeme je analyzovat a zjistit rozdíly mezi zdravým a nemocným či k nemoci náchylným člověkem. [12]

Strukturní geny nejsou po genomu rozprostřeny rovnoměrně. Vyskytují se ve shlucích oddělených dlouhými nekódujícími úseky. Nejméně 50% genomu je tvořeno tzv. repetitivními sekvencemi, úseky, které se opakují. Desetiny procent tvoří

¹ Human Genome Project – info: <http://www.sanger.ac.uk/HGP/>,
http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/links.shtml, <http://www.genome.gov/10001772>

tzv. řídicí sekvence, jež určují, kde má začít přepis genu, jak často se má gen přepisovat apod. Funkce zbývajících částí dosud není jasná.

2.2 VYBRANÉ METODY ANALÝZY GENOMU

2.2.1 Vazebná a asociační analýza

S postupným růstem znalostí o variabilitě lidského genomu byly vytvořeny databáze polymorfních alel. Z počátku to byly alely, které se lišily v délce restričních fragmentů, později alely lišící se v počtu po sobě se opakujících sekvenčních motivů (VNTR, STR), dále jednobazové polymorfismy SNP (single nucleotide polymorphism) a nově též varianty v počtu kopií (ztrát nebo duplikací) rozsáhlých oblastí (10.000 - 5.000.000 bp) genomu – CNV (copy number variation).² [6]

Dnes jsou v lidském genomu známy přibližně 3 miliony polymorfních míst (lokusů), jejichž lokalizace, kombinace a populační frekvence je dostupná prostřednictvím volně dostupných prohlížečů (MapView, Ensembl a UCSC)³ nebo specifických databází (SNP database, HapMap Project).

Analýza výskytu a zastoupení jednotlivých alel je základním nástrojem metod vazebné a asociační analýzy. Tyto metody umožňují určit geneticky podmíněné onemocnění na principu studie vazby dědičnosti studovaného genotypu respektive fenotypu s polymorfními alelami v rodinách, nebo asociaci studovaného fenotypu s polymorfními alelami, případně kombinací alel - haplotypem - v populaci. Prostřednictvím alel nebo haplotypů, které vykazují spojení se studovaným fenotypem, je vymezena chromozomální oblast, kandidátní lokus, ve kterém je pravděpodobně lokalizován hledaný gen. Ten je následně určen pomocí sekvenační analýzy a identifikace patogenní mutace v některém z genů přítomných v určeném chromozomálním lokusu.

Celogenomová vazebná případně asociační analýza je typicky založena na vyšetření několika stovek (v případě STR markerů) až statisíců (v případě SNPs) genotypů u desítek (u vazebné analýzy) až tisíců (u asociační analýzy) osob. [6]

² <http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/>

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>, <http://www.ensembl.org/index.html>, <http://genome.ucsc.edu/>

2.2.2 Metody genotypování

Metody genotypování jsou odlišné podle typu analyzovaných markerů. STR markery jsou analyzovány pomocí elektroforetického odlišení délky jednotlivých alel. V tomto typu analýzy se využívá současné analýzy několika různých markerů, které se liší délkou analyzovaného fragmentu na klasických sekvenátorech DNA. Pro SNP markery je dnes využíváno aplikací DNA čipů, které na základě sekvenčně specifické hybridizace umožňují v jedné analýze určit genotyp až 1 milionu markerů z cca 250 ng genomové DNA.

Metody celogenomové vazebné analýzy byly, jsou a budou základním metodickým nástrojem identifikace onemocnění podmiňujících genů u monogenních chorob.

U polygenních onemocnění je nezbytné využít různých variant celogenomové asociační analýzy založené na určení a porovnávání genotypů stovek tisíc až několika milionů SNP. Výsledky těchto studií vedou k určení diagnosticky významných haplotypů s rizikem rozvoje příznaků onemocnění.[6]

Metody genotypování využívající DNA čipů zůstanou spolu s příslušnými statistickými nástroji analýzy dat v nejbližších letech hlavním nástrojem vazebných a asociačních studií. Kapacita a cena stávajících technologií vycházejících z desítek až stovek nanogramů DNA umožňuje provádění donedávna nepředstavitelných studií tisíců pacientů a kontrol. Zásadním limitujícím faktorem však zůstává schopnost shromáždit a náležitě klinicky definovat rozsáhlé skupiny vyšetřovaných jedinců.[24]

2.2.3 Metody studia genové exprese – transkripční aktivity

Tyto metody sledují, jak se ve zkoumaných biologických materiálech nebo stavech mění spektrum transkriptů jednotlivých genů. Může jít o studie v šíři celého genomu (celogenomové studie) nebo o studie cíleně vybrané skupiny genů. Celogenomové studie genové exprese jsou dnes většinou metodicky založeny na hybridizaci fluorescenčně popřípadě jinak vhodně značených transkriptů nebo příslušné cDNA k sekvenčně komplementárním probám rozmístěným na pevném povrchu (DNA čipy). [6]

3. PRINCIP ČIPOVÉ TECHNOLOGIE

Existence částečně i kompletně zmapovaných genomů již několika organismů, včetně hrubé sekvence lidského genomu, vytvořila v 90. letech poptávku po zařízení schopném ve velmi krátkém čase paralelně detekovat a kvantifikovat expresi desítky tisíc genů a případně identifikovat změny v genetickém kódu. Právě takovéto zařízení představují DNA čipy neboli microarrays.

Vznik a uvedení DNA čipů do praktického využití v roce 1995 byly umožněny na základě miniaturizace, automatizace a adaptace již existujících analyzačních technologií. DNA čipy jsou mikrosystémy založené na schopnosti DNA spontánně najít a navázat své komplementární sekvence vysoce specifickým a reverzibilním způsobem, známým jako hybridizace. Základním principem je hybridizace fluorescenčně značeného vzorku na imobilizovanou sondu, jejíž sekvence je navržena tak, aby prezentovala jeden unikátní úsek DNA. [5][9][8]

3.1 SLOŽENÍ DNA ČIPŮ

Podle charakteru fragmentů - sond - imobilizovaných na povrchu čipu lze rozdělit microarrays do dvou skupin. Zvláště dříve se využívaly jako sondy úseky molekul cDNA (komplementární DNA) vzniklé reverzní transkripcí mRNA. Komplementární DNA dosahuje délky v rozsahu přibližně 100 – 4000bp.

V současné době převažuje využití oligonukleotidových čipů (oDNA). V tomto případě jsou probami uměle syntetizované oligonukleotidy o délce 25 – 70b, jejichž sekvence odpovídá vybraným analyzovaným genům. Oligonukleotidové čipy jsou dnes syntetizovány komerčními firmami a jejich využití je velmi široké. Mohou sloužit k expresní analýze, vyhledávání konkrétních mutací a polymorfismů genů, k resekvenaci a dalším studiím genomu.[9]

	Výhody	Nevýhody
cDNA čipy	<ul style="list-style-type: none"> - není nutná primární znalost sekvence - možnost vlastního nanášení spotů v laboratoři - nárůst intenzity signálu pozitivně koreluje s délkou sondy - delší sonda (=stabilnější hybridizační molekula) umožňuje nastavit více stringentní podmínky, tím se sníží signál pozadí - cenově výhodnější 	<ul style="list-style-type: none"> - možnost cross-hybridizace - možnost kontaminace cDNA klonů/ PCR produktů - časová náročnost přípravy
oligonukleotidové čipy	<ul style="list-style-type: none"> - uniformní délka (do 80b) - automatizace, kontrola kvality během syntézy - vyšší specifita, nižší pravděpodobnost cross-hybridizace 	

Tabulka 1: Srovnání typů sond

(Merkerová M., Kráčmerová A, Bruchová H., Brdlička R.: Využití biočipových technologií v onkologii, Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 333-338) (upraveno autorem)

3.1.1 Nosný podklad

Základem čipu je nosný podklad, na který se nanášecím zařízením připevňují sondy. Podkladem může být nylonová nebo nitrocelulózová membrána, plast i gel.

Ale nejběžnějším povrchem je pravděpodobně mikroskopické sklíčko o velikosti 1 x 25 x 76 mm. Velkou výhodou skla je prostorová stabilita a nízká porozita, která umožňuje práci s menším objemem sond i testovaného materiálu. Jeho nízké fluorescenční pozadí zároveň umožnilo zavést fluorescenční značení testovaného materiálu. Právě tato detekční metoda vytěsnila z použití membrány, kde je nutno značit genetický materiál radionuklidy.

Důležitým parametrem skel je uniformita jejich povrchu, která zaručuje vysokou reprodukovatelnost procesu nanášení a hybridizace. Povrch čipu musí být upraven pomocí hydrofóbních polymerů (poly-L-lysin, modifikovaný silan – aminosilan, epoxysilan apod.) poskytujících reakční skupiny pro navázání sond. DNA fragmenty mohou být modifikovány na 5' koncích aminoskupinou, jejímž prostřednictvím dochází k vazbě. [5][9]

3.1.2 Výběr prob

Prvním krokem při výrobě čipu je výběr genů, které na něm budou zastoupeny. Jsou-li sondami cDNA, získávají se z cDNA knihoven. Zde je mRNA studovaného organismu nebo tkáně přepsána do komplementární DNA, která je následně fragmentována. cDNA o délce 100-4000 bp jsou pomocí univerzálních vektorů inkorporovány do plazmidů bakterií. Klony bakterií rostou na agarové půdě, z nichž každý uchovává jeden konkrétní cDNA fragment. K celkovému pokrytí je zapotřebí několik desítek tisíc klonů. V případě potřeby je cDNA z jednotlivých klonů izolována, amplifikována a po úpravě na jednotnou koncentraci syntetizována na čip.

Oligonukleotidy jsou navrhovány počítačovým softwarem (např. Oligopicker⁴) tak, aby byly komplementární k normálním či mutantním sekvencím DNA, které mají být na čipu analyzovány. Zároveň je zapotřebí, aby byly schopny rozlišit i vysoce homologní sekvence příbuzných genů, včetně štěpných variant mRNA jednoho genu. Kontrolu je možné provést např. programem BLAST⁵. Toto rozlišení není prakticky dosažitelné pomocí cDNA čipů při více než 90% sekvenční shodě.

Oligonukleotidy jsou poté komerčně nasyntetizovány. Důležitou podmínkou je, aby měly podobné parametry pro hybridizaci. Veškeré informace o oligonukleotidu, jeho sekvence, koncentrace a umístění v jednotlivých destičkách, jsou uchovávány nejčastěji v lokálně instalovaných databázích pracovišť.

3.1.3 „Off-line“ technologie

Jednou z možností přípravy čipu je mechanické nanášení již presyntetizovaných sond, a to buď cDNA klonů či jejich PCR produktů, nebo chemicky připravených oligonukleotidů.

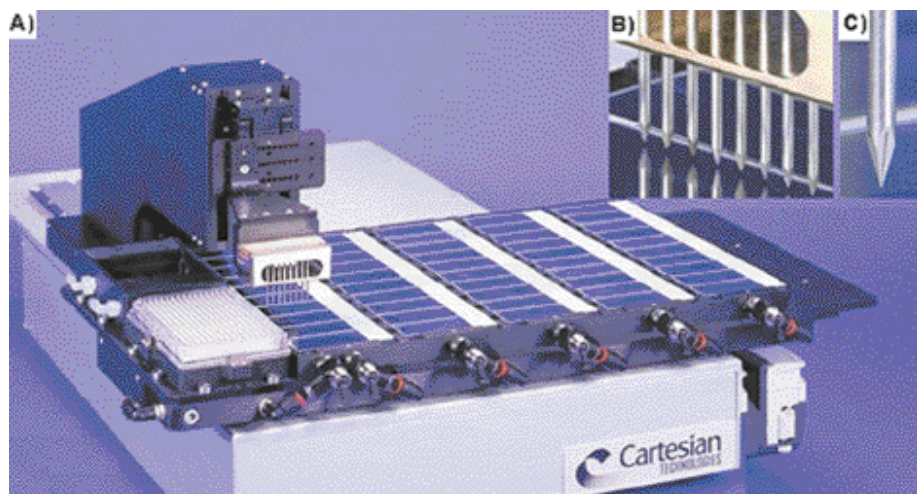
Přenos sond na povrch čipu je úkolem čipovacího přístroje (spotter, microarrayer, mikropipetor). V pracovní hlavě přístroje je umístěno 1 až 64 nanášecích těles, která jsou prostorově uspořádaná tak, aby každé mohlo nabrat sondu z rozdílné jamky v zásobníku. Nanášecími tělesy jsou hroty, které při kontaktu s čipem zanechají na jeho povrchu celý nebo částečný objem přenášené sondy. V současnosti jsou některé hroty vybaveny rezervoárem sond, což značně urychlilo výrobu touto technikou. (Obrázek 3)

⁴ <http://pga.mgh.harvard.edu/oligopicker>

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

„Ink-jet“ technologie patří mezi bezkontaktní výroby čipů. V tomto případě jsou nanášecím tělesem stříkačky, které při pohybu těsně nad povrchem čipu vypuzují ze svých zásobníků prostřednictvím elektromagnetického nebo piezoelektrického systému kapky. Na rozdíl od spotů nanášených kontaktně, jejichž průměr se pohybuje 65-350 μ m, takto vzniklé spoty o průměrech v řádech nanometrů se vyznačují minimální variací v průměru plochy, čímž zajišťují větší kontrolu sond a srovnatelnost výstupů čipů.[9]

Jinou alternativní technologii používá společnost Nanogen (CEA). Pro vytvoření spotu používá mikroelektrických okruhů pro aktivní adresování oligonukleotidových sond do elektrod, které jsou integrované v silikonovém základu čipu.[32]



Obrázek 3: A) Čipovací přístroj společnosti Cartesian Technologies, B) Detail: pracovní hlava s anášecími tělesy, C) Detail: kontaktní nanášecí těleso – štěrbinový hrot

(Svoboda M., Michálek J.: Úvod do technologie DNA čipů, Lékař a technika. ISSN 0301-5491, 2004, vol. 33, no. 3, pp. 67-75)

3.1.4 „In-situ“ výroba

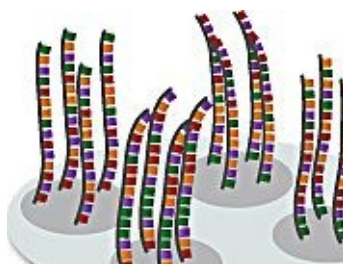
Přímá chemická syntéza na povrchu čipu, neboli „in-situ“ výroba se používá pro výrobu oligonukleotidových čipů. Sériová výroba s možností syntetizovat libovolnou sekvenci sond vedla ke značnému rozšíření těchto čipů.

Narozdíl od „off-line“ metody nelze tuto technologii praktikovat přímo v diagnostické laboratoři. Je doménou platforem produkujících komerční čipy. Stojí za ní nákladné technologické zázemí a obvykle je chráněna patentem.

Kromě široké palety čipů s konstantním složením sond nabízejí společnosti i tzv. Custom array, čip syntetizovaný podle návrhu zákazníka, proto možnost vlastního

navržení a tištění sond na čipovacím přístroji v laboratoři se v současné době přestává uplatňovat, i vzhledem k stále se snižujícím cenám čipů komerčních společností.

Zástupcem této skupiny jsou firmy Agilent Technologies či Incyte Genomics, kde se uplatňuje „ink-jet“ nanášení oligonukleotidů a jejich následná syntéza s využitím fosforamidátové chemie, a firma Affymetrix, která za tímto účelem adaptovala fotolitografickou technologii používanou v elektrotechnickém průmyslu k výrobě polovodičů.[9]



Obrázek 4: oligonukleotidové sondy imobilizované na čipu

(learn.genetics.utah.edu) (upraveno autorem)

3.2 PŘÍPRAVA TESTOVANÉHO MATERIÁLU

Charakter izolovaného materiálu se liší podle účelu použití čipu. Stanovuje-li se profil genové exprese, musíme z testovaného vzorku izolovat celkovou RNA nebo nejlépe mRNA, a to v dostatečné kvalitě a množství. Za dostatečné je považováno 5µg celkové RNA, pokud je vzorek po izolaci amplifikován, je postačující množství 10 – 100ng RNA. Pracujeme-li s čipy určenými pro genotypování, komparativní genomovou hybridizaci nebo resekvenování, musíme získat genomovou DNA.[9]

3.2.1 Odběr a stabilizace vzorku

DNA či RNA pacienta je izolovaná nejčastěji z periferní krve (leukocytů) odebírané EDTA, z tkáně po biopsii, plodové vody nebo lidských sekretů (nazofaryngeální stěr, bronchoalveolární tekutina apod).

Problémem při izolaci RNA je existence RNáz (enzymy katalyzující hydrolýzu RNA), které pochází z kontaminujících organismů, ale jsou i součástí složitých regulačních procesů samotné buňky. Jejich inhibice z tohoto důvodu vyžaduje zachovávání velmi sterilních podmínek při práci s RNA.

Pokud není vzorek ihned zpracován a ošetřen inhibitory RNáz, je nutné tkáň bezprostředně po resekci zamrazit v tekutém dusíku a skladovat při -80°C, čímž je zamezeno degradaci RNA. Za přijatelnou dobu mezi odběrem vzorku a jeho fixací se považuje max. 15 minut.[10]

DNA lze izolovat také z parafinových tkáňových bloků fixovaných pomocí formaldehydu (tzv. FFPE vzorky). Na rozdíl od čerstvých nebo zamražených vzorků mohou být dlouhodobě skladovány. Výhodou takto uchovávaných preparátů je jejich dobrá klinická dokumentace. Nicméně z FFPE vzorků bylo ještě nedávno velmi problematické získat dostatečné množství kvalitní, nedegradované DNA. Nyní jsou však na trhu k dispozici speciálně připravené kity pro izolaci DNA z těchto tkáňových preparátů a také speciálně upravené mikročipy (např. Affymetrix, mikročip GeneChip Human X3P Array).[8]

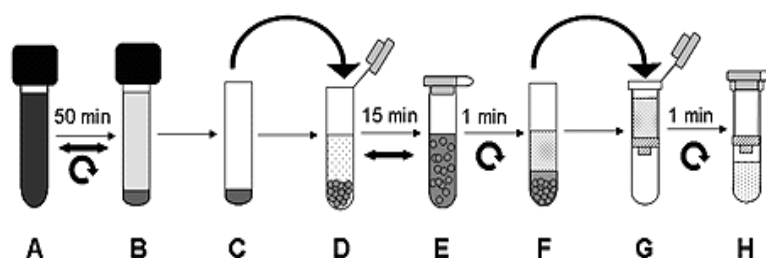
Je-li testovaný materiál buněčně heterogenní (např. bioptický vzorek, obsahující nádorové buňky) a cílem je analyzovat pouze jednu složku, lze separovat žádanou populaci buněk pomocí laserové mikrodisekce (laser capture microdissection – LCM). V případě vzorku krve se dá s úspěchem použít MACS (magnetic cell sorting) nebo FACS (fluorescence activated cell sorting).[4]

Využití těchto metod vyžaduje následné použití amplifikačních technik, protože získané množství materiálu je velmi malé a pro čipy nedostatečné. Lineární amplifikace, které mohou až milionkrát zvýšit výtěžek mRNA, jsou založeny na několikastupňové in vitro transkripci prostřednictvím T7 promotorů. Dostupné amplifikační kity jsou zpravidla limitovány 10ng množstvím celkové RNA, nicméně i 1ng výchozího materiálu může být postačující. V současné době je možné získat dostatečné množství kvalitní RNA i z jediné buňky. [2]

3.2.2 Izolace nukleových kyselin

Pro izolaci nukleových kyselin je k dispozici pestrá škála metod. Při izolaci DNA je prvním krokem uvolnění DNA z vazby na jaderné proteiny a následné odstranění kontaminujících komponent. K lýze zdrojových buněk obvykle stačí rozpuštění biomembrán a denaturace proteinů detergentem (Triton X-100 a laurylsulfát sodný), k lyzačnímu roztoku lze přidat enzym proteináza K, který štěpí bílkoviny včetně histonů vázaných na strukturu DNA.

Klasickou metodou izolace DNA je fenol-chloroformová deproteinace. Výhodou této metody je rychlost a pohodlnost. Zpracování probíhá tak, že jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi, silikagelová membrána). Izolovaná DNA je navázána na povrchu filtru, zatímco nežádoucí komponenty jsou vymyty a čistá DNA je z filtru eluována. (Obrázek 5)



Obrázek 5: Schéma izolace DNA pomocí rozbíjecích skleněných kuliček a kolonky.

Výchozím materiálem je zpravidla 5 ml periferní krve (A). V prvním kroku dochází k lyzi erytrocytů pomocí hypotonického roztoku (B). Tento krok je nutný k odstranění krevního barviva hemoglobinu, který je známým inhibitorem PCR. Zbytek buněk je poté sedimentován centrifugací (C) a peletka přenesena do zkumavky s lyzačním roztokem a skleněnými rozbíjecími kuličkami (D). Poté je zkumavka intenzivně třepána na vortexu, asi 5 - 15 minut (E). Zbytky buněčného debrisu spolu s kuličkami jsou opět sedimentovány centrifugací (F) a supernatant nanesen na kolonku (G). Na té je selektivně zachycena uvolněná DNA, promyta od zbytků proteinů a poté pomocí roztoku se specifickým pH odmyta do sběrné zkumavky (H).

(Lengerová M, Ráčil Z, Hrnčířová K, Volfová P, Lochmanová J, Dvořáková D, Mayer J. Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR – přednosti a úskalí *Klin mikrobiol inf lék* 2007;13(5):184-189)

Kromě kolonkové metody lze použít i vysolení guanidiniiovými solemi nebo izopyknická centrifugace. Při vysolovací technice jsou proteiny a ostatní složky buněčného lyzátu z roztoku odstraněny vysolením pomocí NaCl. Po následné centrifugaci obsahuje supernatant pouze požadovanou gDNA, která se sráží 96% ethanolém. Sraženina se pak rozpouští v pufru nebo ve vodě.[14]

Na izolaci gDNA existuje také řada komerčních kitů, rutinně se užívá například kit QIAamp DNA Blood Mini Kit. Jeho principem je lýza buněk, adsorpce gDNA na silikagelovou membránu, a po jejím promytí eluce do pufru nebo do vody.

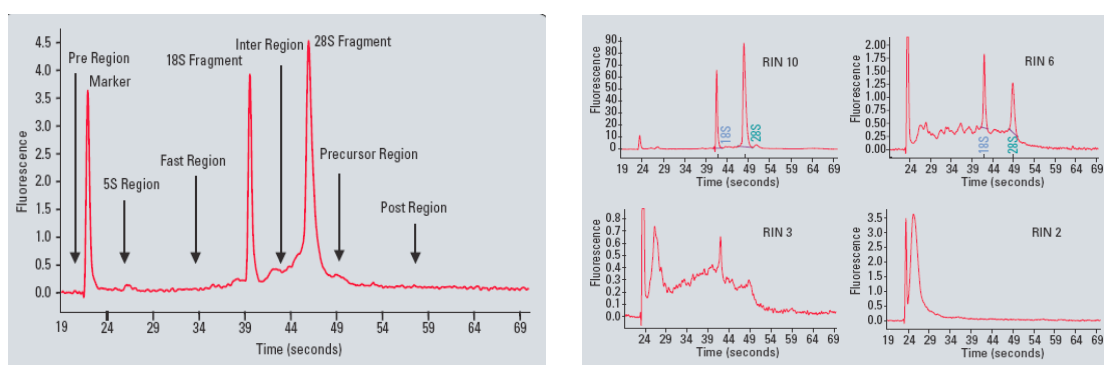
Při izolaci RNA jsou buňky lyzovány nebo homogenizovány v přítomnosti roztoku fenolu a guanidin isothiokyanátu. Přidání chloroformu a následná krátká centrifugace vedou k separaci vzorku do tří fází: 1. vodní fáze, obsahující RNA, 2. interfáze, obsahující DNA a 3. organické fáze, obsahující proteiny. RNA je izolována z vodní fáze precipitací pomocí izopropanolu.

Dalším možným způsobem izolace RNA je použití kitu (např. firmy QIAGEN). Ten je založen na kombinaci vazebných vlastností silikonové membrány s centrifugací. Po lýze materiálu v pufru s obsahem guanidinium thiokyanátu se vzorek nanese na kolonku a promyje etanolem. Následně je RNA eluována do příslušného roztoku.

3.2.3 Kontrola kvality a čistoty

Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty v UV světle je jednoduché a přesné. Měří se při vlnových délkách 260 a 280 nm. Očekávané poměry absorbancí 260/280 se pohybují na hodnotách 1.8 pro DNA a 2.0 pro RNA. Není však schopno nic vypovědět o integritě vzorku, kterou lze ověřit pomocí elektroforézy na agarovém gelu.

Tuto metodu lze použít i pro rychlé posouzení kvality vizuálním odhadem síly proužků, přesnější je samozřejmě využití specializovaného programu určeného pro analýzu gelů. [10] (Obrázek 6)



Obrázek 6: A Modelový elektroforeogram ukazující na jednotlivé části popisující kvalitu izolované RNA. B Elektroforeogram vzorků s různým stupněm degradace RNA. Vzorky postupují od RNA intaktní (RIN 10) po degradovanou RNA (RIN 2). RIN udává míru integrity RNA.

(<http://www.chem.agilent.com/temp/radEFEA1/00001064.PDF>)

3.2.4 Značení materiálu

Dalším krokem přípravy vzorku pro hybridizaci je značení vzorku. Z izolované RNA se buď připravuje fluorescenčně značená jednovláknová l-ss-cDNA (labeled, single strand complementary DNA) nebo komplementární amplifikovaná cRNA.

Značení cDNA se provádí v průběhu reverzní transkripce a může být provedeno buď přímou nebo nepřímou metodou. V prvním případě je na nukleotidy použité k reverzní transkripci (dNTPs) přímo navázána látka, která je schopna po excitaci

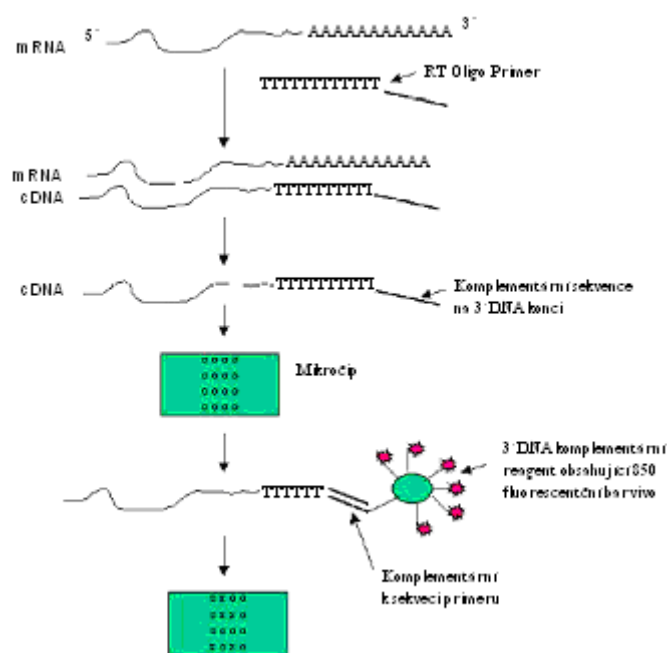
laserovým paprskem emitovat fluorescenční značení určitého vlnového spektra (např. fluorochromy Cy-3 a Cy-5).

U nepřímého značení nesou dNTPs látku schopnou vázat svůj specifický protějšek (např. biotin – streptavidin nebo oligodendrimery), tím je možno zvýšit snímání signálu až stokrát, proto je výhodný při nízkých intenzitách signálu.

V případě přípravy cRNA je v prvním kroku RNA reverzně transkribována do jednovláknové ss-cDNA s inkorporací primerů obsahujících T7 promotorovou sekvenci. K ní je nasyntetizován řetězec a následně je dvouvláknová ds-cDNA transkribována T7 polymerázou do komplementární amplifikované RNA (cRNA). V tomto kroku jsou do molekul cRNA zabudovány ribonukleotidy nesoucí biotin (popř. fluorochrom).

U dvoubarevných čipů se na jednom čipu hybridizuje l-ss-cDNA získaná například z testovaného a referenčního vzorku. Za těchto okolností je nutno každou cDNA označit jiným fluorochromem. Typicky je referenční l-ss-cDNA značená Cy3, která emituje při vlnových délkách 570nm, a testovaná Cy5 (670nm). Výsledek je hodnocen buď číselně jako poměr mezi hodnotou emise referenční a experimentální l-ss-cDNA a nebo pseudobarevně. Barva spotu vzniklá interferencí signálu obou značek potom vypovídá o kvantitativním rozdílu v expresi daného genu mezi oběma vzorky. Nevýhodou dvoubarevných DNA čipů je, že není možno stanovit absolutní úroveň exprese genů.

Jednobarevné čipy jsou navrhované tak, aby absolutní stupeň genové exprese bylo možno určit. K tomu je zapotřebí srovnání dvou oddělených hybridizací. Aby mohly být výsledky ze dvou čipů porovnávány, je nutné zajištění standardizace hybridizačního procesu. Místo referenčního vzorku jsou na těchto čipech přítomny speciální kontrolní sondy, které jsou komplementární k mRNA přidávané do vzorku jako kontrola.[9]



Obrázek 7: Příklad značení vzorků s využitím nepřímého značení, díky kterému dojde k amplifikaci signálu (kit Genisphere). Prvním krokem je reverzní transkripce, k ní je využíván oligo dT primer, který se váže jen na polyA konec mRNA. Tento primer ještě obsahuje specifický overhang, který se využívá pro vazbu fluorescenční značky – 3DNA Capture Reagent

(www.genisphere.com) (upraveno autorem)

3.3 POSTUP VYŠETŘENÍ VZORKU

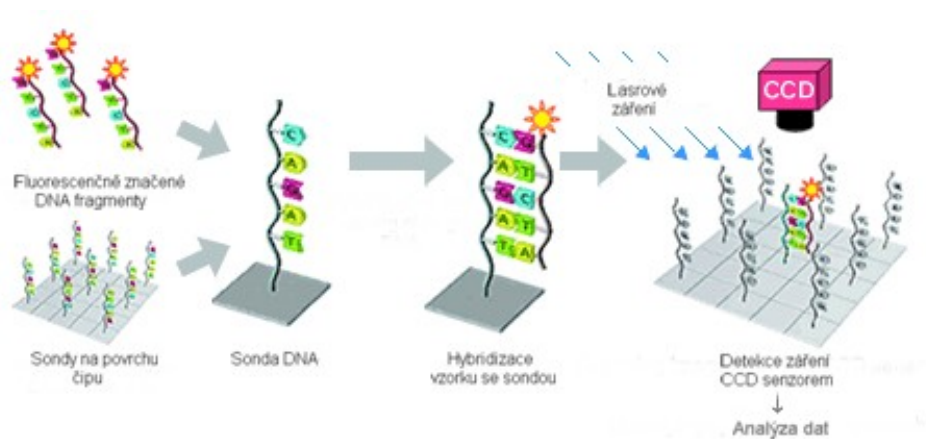
3.3.1 Hybridizace

DNA čipové technologie jsou založeny na hybridizaci nukleových kyselin, tj. interakci mezi DNA sondami imobilizovanými na povrch čipu, které reprezentují zkoumaný gen, a mezi značenými, volnými molekulami nukleových kyselin analyzovaného vzorku. (Obrázek 8)

Značené cRNA nebo cDNA jsou smíchány s hybridizačním pufrům a naneseny na čip. Zde dochází k vzájemnému párování dvou vláken, imobilizovaného a volného, na základě komplementarity bazí.

Hybridizace je ovlivněna teplotou, koncentrací iontů, viskozitou a charakterem testovaného materiálu. K potlačení nespecifické hybridizace jsou do roztoku s testovaným materiálem přidávány kompetitivní substance, které vyvazují především oblasti tandemových repetit. Po aplikaci hybridizačního roztoku je čip inkubován ve vlhké komůrce nebo ve speciálních hybridizačních pecích. Po inkubaci je zbylý materiál odmyt pufrů se snižující se koncentrací solí.

U čipů, kde byl testovaný materiál značen přímou metodou, je možno ihned přistoupit ke snímání výsledků. Čipy s nepřímou značením vzorkem jsou podrobeny procesu sekundárního značení.



Obrázek 8: Schéma hybridizace vzorku se sondami

(<http://museum.toshiba.co.jp/05human/newtech121.html>)(upraveno autorem)

3.3.2 Detekce záření

Vizualizace a vyhodnocení výsledku začíná detekcí fluorescenčního záření vyvolaného laserovým paprskem. Provádí se buď pomocí zařízení, která jsou pro tento účel vybavena CCD kamerou (charge-coupled device), častěji jsou snímány speciálními scannery.

CCD kamery a scannery generují 16 bitový obraz, který je uchováván v TIFF formátu. Pro každý excitační kanál vzniká jeden obraz. U dvoubarevného značení jsou analyzované vzorky excitovány zvlášť a jejich fluorescenční záření je detekováno po spektrální separaci.

Pro stanovení hodnoty přirozeného fluorescenčního pozadí jsou čipy vybaveny sondami negativních kontrol, jejichž sekvence se nevyskytují v analyzovaném genomu. Jejich emisní hodnota naměřená po excitaci je následně odečtena od hodnot získaných z referenčních sond. Pro korekci pozadí se užívá různých statistických metod v závislosti na kvalitě a vlastnostech generovaného obrazu.[9]

3.3.3 Analýza obrazu

Naskenovaný obraz je analytickým softwarem v počítači automaticky vyhodnocen a pseudobarevně znázorněn. Následuje základní obrazová analýza složená ze tří základních kroků. Pomocí speciální mřížky se definuje umístění každého spotu, jehož intenzita signálu je převedena do korespondujícího množství pixelů. Současně dojde k oddělení spotů, jejichž intenzita odpovídá množství specificky hybridizovaného materiálu, od nespecifického pozadí. Intenzity spotů jsou dále kvantifikovány a ze získaných dat je vygenerována digitální databáze výsledků, kterou je možno dále zpracovávat. Tato data jsou nazývána „raw data“ a jsou vstupními hodnotami pro bioinformatickou analýzu.[1]

3.3.4 Bioinformatická analýza

Normalizace se používá ke standardizování mikročipových dat. Účelem je identifikace a odstranění systematických chyb, jako je různá efektivnost značení, fluorescenční vlastnosti Cy3 a Cy5 značek, rozdílné skenovací parametry (PMT) a jiné. Umožňuje to vyhodnotit a porovnat data z různých mikročipových analýz ve společném měřítku.

Následná statistická analýza je úkolem statistiků a bioinformatiků. Pro analýzu se využívají komerční open-source počítačové programy. Analýza se v zásadě liší podle druhu experimentu a požadovaných výsledků. Interpretace statistických analýz vyžaduje spolupráci jak statistiků a informatiků, tak buněčných, molekulárních a systematických biologů. [16]

3.3.5 Databáze mikročipových experimentů

Nedokonalá reprodukovatelnost čipových experimentů znesnadňuje objektivní srovnání výsledků. Proto vznikly projekty, které mají usnadnit sdílení analyzovaných dat v podobě volně přístupných databází. Týkají se v podstatě všech oblastí experimentu, ať už předepisují standardy a kontroly kvality měření u čipových vyšetření v klinické či farmaceutické praxi (MAQC - Microarray Quality Control), nebo se snaží o sjednocení údajů z expresních genů (MGED- Microarray a Gene Expression Data).

Světovým standardem je konsorcium MIAME (The Minimum Information About a Microarray Experiment). Jde v podstatě o kontrolní seznam definující úroveň detailů, které by měly na čipu existovat. Řada prestižních časopisů vyžaduje

pro publikaci čipového experimentu zařazení výsledků experimentu do databáze GEO (Gene Expression Omnibus⁶), ve které publikované články musí splňovat MIAME standardy. Mezi další rozšířené databáze patří také například Stanford Microarray database nebo ArrayExpress, který spravuje European Bioinformatics Institute (EBI⁷).[16]

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

⁷ <http://www.ebi.ac.uk/>

4. KLASIFIKACE ČIPŮ

Klasifikace čipů není zatím příliš jednotná a závisí na přístupu autora. Na základě počtu a velikosti spotů lze rozdělit čipy na „makročipy“ (macroarrays) a „mikročipy“ (microarrays).

Makročipy se obecně vyznačují nízkou hustotou nanesených sond a „relativně“ (ve srovnání například s podložním sklíčkem) velkými rozměry. Převážně jde o nylonové membrány, jejichž velikost se většinou pohybuje v desítkách centimetrů a nesou řádově stovky sond⁸. [8]

Typickým příkladem mikročipů je klasické podložní sklíčko o velikosti 75x25 mm, přičemž nanesená plocha je mnohem menší. Komerční mikročipy pak mají i jiné formáty. Nejběžnější mikročipy nesou na svém povrchu tisíce až desetitisíce jednotek (1000–60 000).

Díky velké vazebné kapacitě a možnosti navazování různých biomolekul na povrch nosičů jsou čipové techniky využívány v nejrozumnějších odvětvích molekulární biologie.

4.1 ČIPY PRO GENOVOU EXPRESI

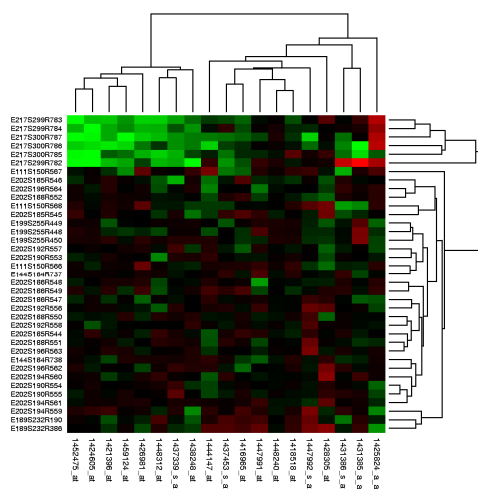
Analýza genové exprese byla vůbec prvním vyšetřením, které bylo provedeno systémem předcházejícím dnešním mikročipům. Stalo se tak v roce 1987 a jednalo se o soubor fragmentů DNA připevněných na filtrační papír.

DNA-microarrays mají i dnes v této oblasti velké uplatnění, protože umožňují velmi elegantně sledovat rozdíly v intenzitě exprese (v množství různých mRNA) u tisíce genů současně. Lze tak studovat různé funkční stavy buněk, ale i vlivy léčby či nemoci na genovou expresi. Tím, že porovnáme hladiny exprese například infikované buňky nebo tkáně s neinfikovanou, můžeme například rozpoznat ty geny, jejichž exprese je pozměněna reakcí na nějaký patogen nebo jiný organismus.

Nabídka specificky zaměřených expresních čipů je v současné době velmi pestrá. Vedle celogenomových mikročipů (Affymetrix, Agilent) jsou k dispozici čipy,

⁸ Například nylonový čip Atlas Human cDNA Expression Array od firmy Clontech sleduje expresi 588 genů na membráně o rozměru 8 x 12 cm

kteře umožňují detekovat hladiny pouze vybraných skupin genů. Například firmy Clontech či SuperArray nabízí čipy se sondami pro sledování aktivity genů, u nichž se předpokládá vliv na maligní transformaci buňky. Hlavními funkčními kategoriemi jsou geny účastníci se regulace buněčného cyklu, apoptózy, diferenciace, buněčné signalizace a také geny, jejichž produkty se uplatňují jako transkripční faktory, adhezivní molekuly či povrchové receptory. V současné době se nabízí možnost navrhovat čipy, které by dovolily monitorovat geny zapojené do konkrétní signální dráhy. [2]



Obrázek 9: Způsob zobrazení (tzv. heat mapa) diferenciální exprese genů. Jedná se o dvoudimenzionální mapu, která ukazuje up- (zeleně) a downregulované (červeně) geny, umožňuje základní klastrovací analýzu.

(http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray#cite_note-Adomas_et_al-3)

4.2 GENOTYPOVACÍ ČIPY

Čipy lze využít i pro sekvenování, kdy jsou na čip nanесeny všechny varianty sekvence testovaného úseku DNA. Tento způsob sekvenování je oproti běžně používaným technikám mnohem složitější, neboť zahrnuje syntézu všech sekvenčních variant.

Vhodnější je použití čipů pro detekci mutací (mutovaná forma genu versus nemutovaná), SNP (single nucleotide polymorphism) a STR (short tandem repeat) polymorfismů, což nabízí řadu uplatnění (DNA diagnostika, populační screening, určování otcovství, forenzní genetika, HLA typizace, evoluční studie, mapování atd.). Obzvláště u nemocí s velkým počtem popsanych kauzálních mutací (např. cystická

fibróza) představují čipy velmi užitečnou metodu umožňující záchyt i vzácných mutací, které nejsou rutinně testovány.

4.2.1 SNP detekce

Genotypovací microarrays jsou vysoce citlivé čipy dovolující určit genetickou odchylku u jednotlivce nebo i napříč populací. Krátké oligonukleotidové sondy jsou sestavené tak, aby byly schopné identifikovat jednonukleotidové záměny (SNPs), tedy jednonukleotidové variace sekvence DNA. Tyto snahy vycházejí z faktu, že z celkového odhadovaného počtu 11-15 milionů genetických polymorfismů u člověka tvoří přes 90% právě SNP.

Čipy pro detekci polymorfismů jsou vybavené krátkými oligonukleotidovými sondami, obvykle o délce 25 bází. Metoda je založena na měření síly hybridizace oligonukleotidů odpovídajících jednotlivým sekvenčním variantám. Jako kontrola se používají oligonukleotidy se záměrně vnesenou chybou. To znamená, že každá sonda se na čipu objevuje ve čtyřech téměř identických kopiích, sekvenčně specifických pro každou variantu; neboli každá z nich má na shodném místě v řetězci jiný nukleotid. Pro každý SNP bývá navrženo více sond (např. 40 sond pro jeden SNP firmy Affymetrix).

Pomocí nejmodernějšího 500k GeneChip od firmy Affymetrix lze určit najednou genotyp 500 000 SNPs, o 250 000 SNPs na dvou čipech.

4.2.2 Resekvenační čipy

Tyto čipy byly vyvinuty pro sekvenaci části genomu jednotlivců. Jejich použití obvykle navazuje na mapovací celogenomovou analýzu, z níž se určí místa potencionálně obsahující polymorfismus. Používají se například pro určení polymorfismů způsobujících populační choroby – určení zárodečných mutací nebo somatických mutací.[16]

4.3 KOMPARATIVNÍ GENOMOVÁ HYBRIDIZACE (CGH)

CGH arrays se v dnešní době staly významnou technikou užívanou při analýze genomu. Využívají se pro detekci změn v počtu kopií genů nebo chromozomů, popřípadě jiných chromozomových přestaveb. Změny v počtu kopií DNA jsou jednou z mnoha abnormalit, kterými může být ovlivněna exprese a funkce genů. Proto určení

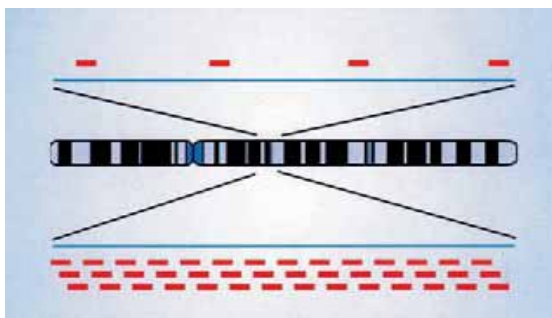
nebalancovaných změn, které představují především amplifikace a delece chromosomových oblastí a genů v nich lokalizovaných, dovoluje určit kritické geny a signální dráhy zahrnuté do vzniku a vývoje onemocnění.

Základní metodou je porovnávání DNA vzorku a kontroly pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH). Výhodou technologie CGH je možnost analýzy celého genomu v jediném experimentu.[7]

4.4 TILING ARRAY

Přestože je možné konstruovat čipy s různým počtem klonovaných DNA v jednotlivých chromosomových oblastech, je výběr četnosti klonů velmi individuální. Může vést k tomu, že některé oblasti jsou nepokryté. (Obrázek 10)

Ishkanian a spol. jako první sestavili CGH čip pro pokrytí skutečně celého genomu. Jde o tzv. submegabázové rozlišení, neboli překrývající se oligonukleotidy navržené tak, aby pokryly celou oblast zájmu. Význam této konstrukce tkví v tom, že takovýmto čipem lze detekovat mikrozměny, které při použití jiných čipů zůstanou skryty.[7]



Obrázek 10: Znázornění možností volby klonů pro konstrukci čipu. A – Rozlišení čipu je dáno počtem a vzdáleností jednotlivých vybraných klonů v daných oblastech. B – Příklad volby klonů pro konstrukci tiling array, ve kterém se jednotlivé klony vzájemně překrývají.

(Jarošová M., Pospíšilová H., Plachý R., Papajík T., Koptíková J., Indrák K.: Určování nebalancovaných genových změn metodou array komparativní genomové hybridizace (array CGH) u nádorů, Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 342-346)

4.5 SROVNÁVACÍ GENOMOVÉ SEKVENOVÁNÍ (CGS)

CGS metoda je příbuzná metodě CGH, ale místo k srovnání dvou vzorků genomu stejného živočišného druhu se používá k vyhledání a určení odlišnosti např. dvou bakteriálních druhů, z nichž sekvence jednoho je známa. Vychází z předpokladu, že fragmenty DNA pocházející ze zkoumaného organismu budou úspěšně hybridizovat se sondami komplementárními k známému druhu. Hybridizujících sond by měla být u příbuzných organismů většina. Nehybridizující sondy ukazují na místa, kde se sekvence organismů liší. Rozlišovací schopnost metody souvisí s velikostí sond. Čím jsou oligonukleotidové sondy kratší, s tím větší přesností je možné lokalizovat místo odlišnosti.

Místa, kde se sekvence odlišují, jsou vyšetřena pomocí hybridizace k dalším, na míru připraveným sondám a je tak určena míra odlišnosti neznámého organismu na daném místě.[11]

4.5 CHROMATINOVÁ IMUNOPRECIPITACE NA ČIPU (CHIP-ON-CHIP)

ChIP-on-chip metody slouží ke stanovení epigenetických změn chromatinu. Epigenetický stav příslušné kódující oblasti a hlavně promotoru, jako místa iniciace transkripce, je zásadní pro regulaci transkripční aktivity genů. To, společně s transkripčními faktory, rozhoduje o optimální expresi genů.

DNA sekvenci náležící ke konkrétnímu proteinu lze izolovat pomocí imunoprecipitace daného proteinu a získané fragmenty je možné hybridizovat na čip. To dovolí určit vazebné místo proteinu kdekoli v celém genomu.

Příkladem může být sledování změn v promotorových oblastech stovek genů, kde výstupem jsou rozsáhlá data vypovídající o epigenetických profilech nádorových buněk. To poskytuje cenné informace v rozdílech mezi normální a maligně transformovanou buňkou. [7]

4.6 ČIPY PRO IDENTIFIKACI METHYLACE DNA

Methylace DNA je endogenní buněčný proces, při němž dochází k adici methylové skupiny na bázi cytosin nebo adenosin. V důsledku toho dochází k inhibici

aktivity genu čili k tomu, že se tento gen nemůže projevit. Hraje tak důležitou roli v regulaci genové exprese.

Při analýze methylace DNA můžeme sledovat aktivitu genů např. při patologických změnách v genomu buňky (nádorové bujení), ale i aktivitu genů při různých vývojových stádiích buňky a organismu. [21]

5. NEJVÝZNAMNĚJŠÍ VÝROBCI KOMERČNĚ VYUŽÍVANÝCH ČIPŮ

Čipové technologie se začaly rozvíjet zhruba před 10 lety. Jejich použití stále vzrůstá a rozšiřuje se množství jejich aplikací. Vývoj se ubírá v zásadě dvěma směry. Směrem k neustálému zvětšování počtu současně prováděných detekcí a směrem k čipům specializovaným k řešení určitých specifických otázek.

Historicky je vznik a rozmach firem zabývajících se vývojem a výrobou čipových technologií spojen s Kalifornií. Dnes jsou již ale roztroušeny po celém světě, dokonce i v České republice vznikla na akademické půdě pracoviště, která vyrábí pro své potřeby vlastní DNA čipy.⁹ Přehled těchto firem je možno nalézt na: <http://www.biochipnet.com/companies>. [3]

Mezi celosvětově nejvýznamnější hráče na poli čipových technologií se řadí společnosti Affymetrix, Illumina, Agilent Technologies a Roche NimbleGen.

5.1 AFFYMETRIX

Koncem osmdesátých let vznikla Affymetrix GeneChip technology. Za vším stála představa, že lze sloučit technologii používanou v polovodičovém průmyslu s chemickou a upevnit tak obrovské množství biologických dat na malý skleněný čip. Technologie byla uvedena do praxe v roce 1992.

Dnes je společnost se sídlem v Santa Clara, Kalifornie, považována za standard v oblasti analýzy genetické informace. [20]

5.1.1 Syntéza sond – Fotolitografická syntéza oligonukleotidů

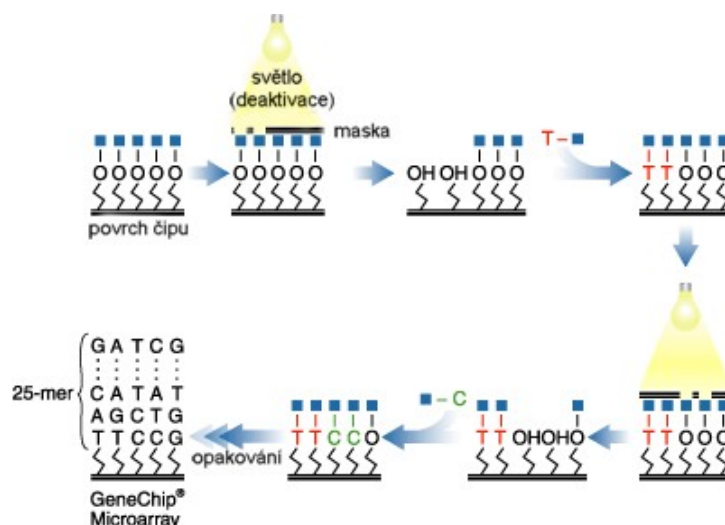
Před zahájením syntézy je čip pokryt křemíkovou vrstvou, která má na svém povrchu navázanou molekulu fotosenzitivní ochranné látky. Pokud není tato látka

⁹ www.geneatech.com

deaktivována světlem, znemožňuje vazbu mezi křemíkem a nukleotidy, které se v roztoku nanáší na čip. Aktivaci a deaktivaci vazebných míst zajišťuje neprůhledná maska s přesně navrženými otvory. Světlo, které jimi prochází, dopadá na požadované oblasti čipu.

Samotná syntetická fáze začíná aplikací roztoku, který obsahuje jednu ze čtyř možných bází. Po ozáření nekrytých míst dojde k odblokování vazeb ochranné látky a následné reakci mezi uvolněným koncem křemíku a nukleotidu. Zbylý roztok je po inkubaci pečlivě odstraněn. Popsaný proces se třikrát zopakuje, ale vždy jsou světlem, za použití nové masky, deaktivována odlišná místa a aplikován roztok s dosud nepoužitým nukleotidem.

Po uvedených čtyřech cyklech jsou vazebná místa obsazena jedním z nukleotidů A, C, G, T; první bázi imobilizované sondy. Stejně jako křemík jsou nukleotidy opatřeny na svém volném konci protektivní látkou, která zabraňuje reakci až do deaktivace světlem. Celá syntetická fáze může začít znovu a opakuje se až do dosažení požadované délky sond, obvykle 25 nukleotidů. (Obrázek 11)



Obrázek 11: Fotolitografická syntéza čipu (GeneChip, Affymetrix)

(<http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx>) (upraveno autorem)

Výrobní proces končí komplexní kontrolou kvality. Verifikační testy jsou, stejně jako syntetický proces, převzaté z elektrotechnického průmyslu. Jde převážně o speciální softwary, které monitorují tři oblasti – vzhled masky, syntézu sond a kvalitu signálu. [20]

5.1.2 Struktura čipu

Ačkoliv existuje několik druhů čipů GeneChip, všechny pracují na společném základním principu. Ploška mikročipu je rozdělena do čtverců o velikosti $11 \times 11 \mu\text{m}$, z nichž na každém jsou navázány kopie pouze pro jediný typ sondy. Nejnovější mikročip firmy Affymetrix nese těchto čtverců celkem 1,3 milionu. Ale počet polí může být individuální v závislosti na požadavcích experimentu a počtu sond.

K identifikaci každého genu je zapotřebí 11-20 (dle čipu) odlišných referenčních sond o rozsahu obvykle 25 oligonukleotidů, tzv. perfect match probe cell. Ty jsou derivované z různých nebo po sobě jdoucích částí kódující sekvence daného genu.

Každá ze sond je zároveň doplněna o tzv. mismatch probe cell, mutovanou sondu, která se od svého referenčního protějšku liší přítomností jedné bodové mutace uprostřed oligonukleotidu. Mismatch slouží jako vnitřní kontrola specifické hybridizace. Zatímco perfect match probe slouží k detekci fluorescenčního signálu navázaného ze vzorku, fluorescence zachycená z mismatch sond představuje signál pozadí, protože na jejím řetězci probíhá nespecifická hybridizace. Rozdíl těchto dvou signálů je signál výsledný. [20]



Obrázek 12: GeneChip Human Mapping 100K Set

(http://www.roswellpark.org/Research/Shared_Resources/Gene_Expression_Resource/DNAMappingArrays)

5.1.3 Pole uplatnění

Affymetrix využívá GeneChip ve všech oblastech genomiky, od genotypování a hledání polymorfismů po studium exprese genů, které může být zároveň kombinováno s ChIP-on-chip metodou pro určení transkripčních faktorů v celé šíři genomu, respektive jejich vazebných míst.

Dominantní oblastí je ovšem analýza genomu a vyhledávání jeho abnormalit, ať už v celém rozsahu nebo v konkrétním úseku. Každá sonda je navržena tak, aby rozeznala jednu sekvenci z bilionu a tím určila zda komplementární sekvence je nebo není přítomna ve vzorku. Takto vysoká specifita je nutná v případě, že je potřeba rozlišit čtyři sekvence, které se liší pouze v jediné bázi. Vyjádření genu v několikanásobném množství referenčních sond zároveň zajišťuje vysokou senzitivitu a reprodukovatelnost. U GeneChip Mapping Array pro genotypování, vyhledávání SNP a CNV poruch se používá 40 sond, pro jeden gen u exprese genu je to 22 sond.

Pole působení sekvenční analýzy se u Affymetrix omezuje na lidský genom, ostatní aplikace je však možné využít pro velké spektrum organismů od nejjednodušších prokaryot napříč živočišnou i rostlinnou říší¹⁰. [20]

5.2 ILLUMINA

Společnost se sídlem v San Diegu, Kalifornii, založili v roce 1998 John Stuelpnagel a Mark Cheek. Praktickým začátkem ovšem bylo získání licence pro BeadArray technologii, kterou vyvinul John Stuelpnagel na Tufts University.

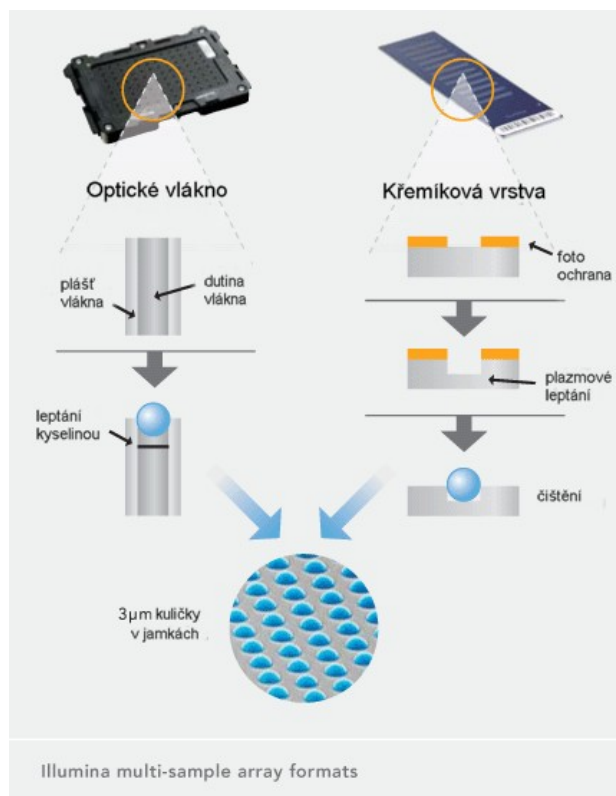
Od roku 2005, kdy získala Cyvera Corporation, nabízí Illumina tři různé přístupy v analýze genetických variací a funkcí. Oblasti sekvenování dominuje analyzátor genomu, VeraCode technologie umožňuje prostřednictvím holografických kódů na skleněných deskách analýzu celého genomu a jeho funkce. Nejobjemnější oblast působení společnosti Illumina je ale mikročipová technologie. [26]

5.2.1 Syntéza sond – BeadArray Technology

Jde o proces, při kterém dochází k transferu a uložení předem připravených sond na plochu čipu. Každý oligonukleotid je ve stovkách až tisících kopiích přichycen na křemíkovou kuličku - bead, která je skládána na mikrostěnu čipu. Po umístění jsou kuličky připojeny k povrchu pomocí van der Waalsových sil a hydrostatických interakcí se stěnou. Každá kulička má velikost 3 μm a je na čipu vzdálena přibližně 5,7 μm od dalších. (Obrázek 13)

¹⁰ Arabidopsis, ječmen, skot, c. elegans, pes, kuře, citrus, balvna, Drosophila, kukuřice, myš, topol, prase, krysa, rýže, soja, cukrová třtina, rajský, pšenice, Xenopus tropicalis, kvasinky, zabrafisch

Mikrostěnu čipu tvoří jeden ze dvou používaných substrátů: svazek optického vlákna nebo křemíková deska.



Obrázek 13: Ilustrace BeadArray Technology, použití na obou možných površích

(http://www.illumina.com/media.ilmn?PageName=BeadArray%20Technology&Img=about_beadarrayTechOverviewLg.gif&Cap=&PageURL=5) (upraveno autorem)

Proces výroby zahrnuje řadu kontrol kvality. Nejdůležitější z nich je funkční test zvaný dekódování (kontrolní hybridizace), který potvrdí přítomnost a funkčnost sond. [26]

5.2.2 Struktura čipu

Společnost Illumina volí pro každý experiment jiné navržení čipu, ať už jeho povrch, délku oligonukleotidů či hustotu sond. Podle druhu produktu jsou pro jeden gen na povrchu imobilizovány jedna nebo dvě sondy o 50 bázích. Obvykle jsou na čipu ve třiceti kopiích, což zvyšuje spolehlivost výsledků.

Obecně jsou mikročipy navrženy tak, aby byly plně kompatibilní se standardními chemikáliemi či barvicími metodami. Výjimku tvoří technologie GoldenGate a Infinium technologie, což je speciální genotypizační postup, který využívá DNA polymerázy a ligázy k inkorporaci do SNP oblastí. [26]



Obrázek 14: The Universal-96 Array Matrix (FA-12-203) and Universal-16 BeadChips (GT-95-210, GT-95-211 and GT-95-212)

(<http://www.illumina.com/pages.ilmn?ID=11>)

5.2.3 Pole uplatnění

Společnost se zabývá analýzou jak DNA tak i RNA. GoldenGate technologie umožňuje analýzu genomu v celém rozsahu a zároveň zachycuje SNP polymorfismy. Infinium je technologie, která se využívá zejména k zachycení chromozomálních aberací (CNV). Například HumanCNV370-Duo a Human1M DNA Analysis BeadChip, vyvinuté ve spolupráci s deCODE Genetics, dokáží zaměřit cca 9000CNV (jako duplikace segmentů, megasatelity) či 55000 markerů (SNP). Tyto metody jsou aplikovány i pro DNA metylaci, která hraje důležitou roli v regulaci genové exprese.

Genová exprese je analyzována z RNA. Kromě celogenomové exprese společnost nabízí DASL (cDNA-mediated Annealing, Selection, Extension, and Ligation) metodu, která umožňuje expresi genu z degradovaného materiálu.

Pole uplatnění je omezeno na člověka, myš a potkana. [26]

5.3 AGILENT TECHNOLOGIES

Kořeny firmy sahají až do roku 1939, kdy Bill Hewlett a Dave Packard založili společnost, která se následně výrazně zasloužila o rozvoj průmyslu. Ačkoliv rozvoj čipové technologie probíhal od začátku 90. let, samostatný Agilent Technologies vznikl v roce 1999 odtržením od Hewlett-Packard Company kvůli odlišné cílové oblasti uplatnění. Začátky v rámci úspěšné firmy však přinesly možnost modifikovat zažité technologie do nové oblasti.[21]

5.3.1 Syntéza sond – SurePrint

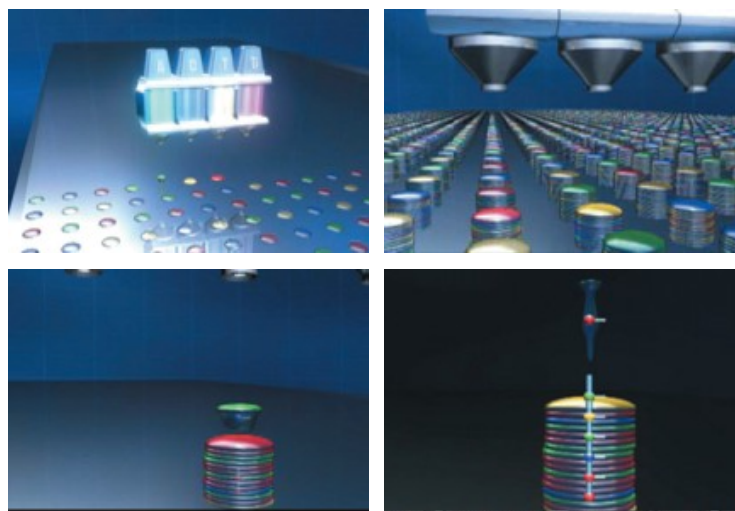
SurePrint je proces totožný s klasickým inkoustovým tisknutím. Rozdíl tvoří pouze použité elementy.

„Inkoustem“ je suspenze sond. Při „off line“ výrobě jsou sondami PCR klony (vytvořené sadou Incyte Genomics' LifeSeq clone sets), popřípadě předem nasyntetizované řetězce oligonukleotidů. Pro „in situ“ výrobu je v roztoku rozpuštěna vždy jedna báze.

Nanášecí zařízení se skládá z hlavice, ve které jsou uloženy trysky. Součástí jsou zásobní nádržky (cartridge), jako rezervoár nukleotidů. Proces je řízen počítačem, který zároveň zajišťuje jeho kontrolu (Real Time Visual Monitoring).

Pro nanesení sond postačí několik mikrolitrů suspenze na tisíce čipů. Po aplikaci první sady cDNA klonů, jsou rezervoáry a trysky vyprázdněny a důkladně vyčištěny, aby nedošlo ke cross-kontaminaci s řetězcí, které jsou následně tištěny. Původní suspenze je nahrazena novou a proces nanášení se opakuje, dokud nejsou všechny kontrolní i referenční sondy nanесeny na každý čip. Vazebná vrstva je pak deaktivována, aby nedošlo k nespecifickému navázání nečistot, které by mohlo zvýšit fluorescenční pozadí.

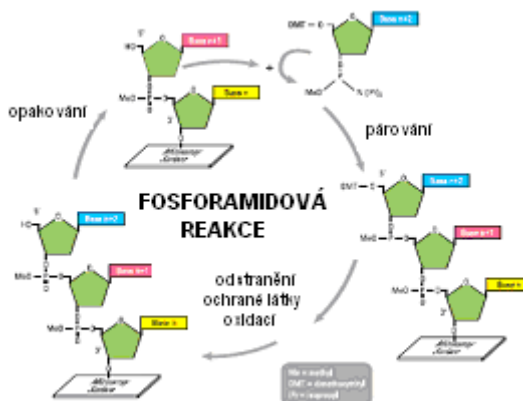
Technika „in situ“ výroby se téměř neliší od nanášení cDNA řetězců, jen se místo celých oligonukleotidů nanáší báze po bazi, které se spojují prostřednictvím fosforamidových vazeb. (Obrázek 15)



Obrázek 15: Ink jet printing A) nanášení první řadynukleotidů na aktivní povrch B) sondy po nanesení několika nukleotidů C), D) přidávání nové báze do řetězce

(http://www.chem.agilent.com/scripts/cag_filexfer.asp?iWHID=31888)

Po té, co je natištěna první base, je oxidována tritilová skupina, která chrání 5' hydroxylovou skupinu nukleotidu, čímž umožní reakci s 3' koncem následující base. Mezi každým krokem je nadbytek bazí vymyt. Tento proces se opakuje do dosažení požadované délky sond, obvykle 60 bazí. (Obrázek 16) [21]



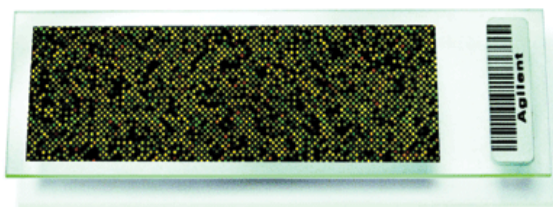
Obrázek 16: Znázornění fosforamidových reakcí

(http://www.chem.agilent.com/scripts/cag_filexfer.asp?iWHID=31888) (upraveno autorem)

Agilent garantuje, že na čipu je minimálně 95% sond, proto je každý z nich zatěžkán souborem kontrol kvality. Hodnotí se jak použité elementy, tak přesnost nanášení. Velký důraz je kladen na uniformitu, důležitou k porovnávání výsledků více čipů.

5.3.2 Struktura čipu

Design čipů se liší u každého konkrétního vyšetření. Každý z čipů nabízí detekci řádově deseti tisíců genů na sondách o délce standardně 60 bazí. Pro přibližně 100 vybraných genů jsou na čipu přítomny reprodukovatelné sondy v několika kopiích, které zajišťují vnitřní kontrolní měření. [21]



Obrázek 17: The Agilent Whole Human Genome Microarray represents over 41,000 human genes and transcripts

(<http://www.nature.com/nmeth/journal/v1/n3/full/nmeth1204-263.html>)

5.3.3 Pole uplatnění

Společnost se zabývá zejména výrobou čipů pro studium genové exprese. Klasická expresní analýza je nabízena v jedno- nebo dvoubarevných variantách. Dvoubarevné značení společnost uplatňuje i u ChIP-on-chip technologie a studiu methylace DNA.

Pro vyšetření genomu nabízí společnost dvoubarevné čipy pro komparativní genomovou hybridizaci. Pomocí speciální barvicí metody nabízí také čipy pro microRNA detekci.

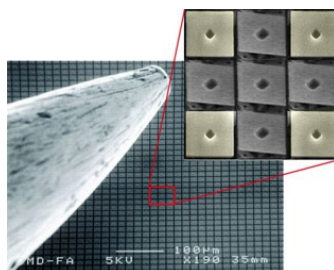
Většinu technologií společnosti je možné použít na lidské, myší a potkaní vzorky. Nabízí však zakázkové čipy, kde si lze kromě designu čipu zvolit mezi několika živočišnými i rostlinnými druhy. [21]

5.4 ROCHE NIMBLEGEN

NimbleGen je firma se sídlem v Madisonu v USA založená v roce 1999. Maskless technologie, na kterou společnost získala celosvětovou licenci, byla vyvinuta na University of Wisconsin - Madison.[27]

5.4.1 Syntéza sond – Maskless Array Synthesiser (MAS) technology

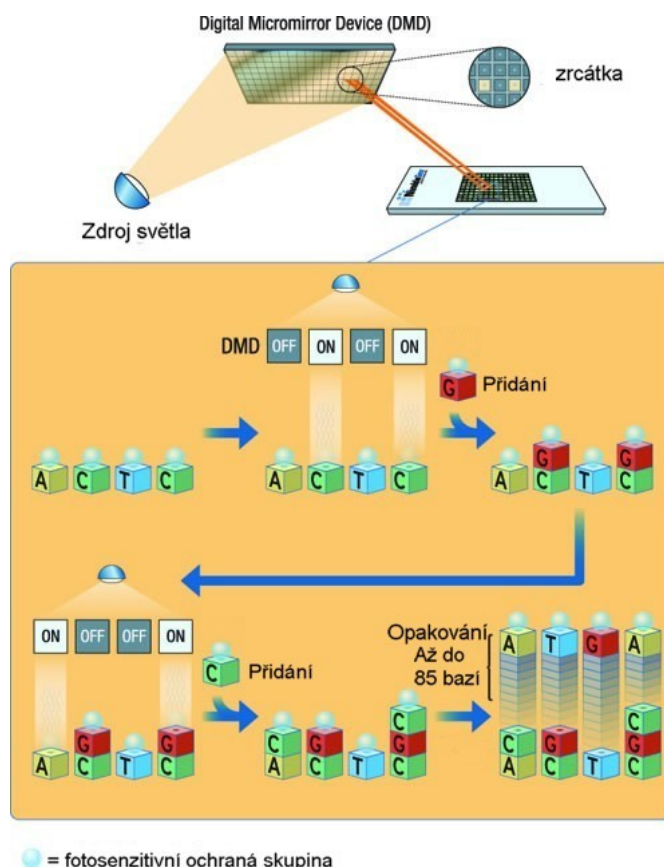
NimbleGen vyrábí zakázkové DNA čipy o vysoké hustotě sond. V srdci systému je Digital Micromirror Device, které k ovzorkování čipu využívá světla reflektovaného ze 786 000 až 4,2 milionu miniaturních hliníkových zrcátek. Vytváří tak virtuální masku, která nahrazuje klasickou chromovou běžně používanou v mikročipové výrobě. Tato maska odráží požadovaný vzorec viditelného světla nasměrovaný na korespondující místo čipu.(Obrázek 18)



Obrázek 18: Digital Micromirror Device s mikrozrcátky s přiloženou špičkou špendlíku pro srovnání

(<http://www.nimblegen.com/technology/manufacture.html>)

Další průběh syntézy je obdobný jako u fotolithografické techniky společnosti Affymetrix. Světlem jsou aktivována vazebná místa, respektive je deaktivována ochranná látka na konci nukleotidu, což umožňuje přidání dalšího nukleotidu do řetězce. (Obrázek 19)



Obrázek 19: Ilustrace MAS technologie

(<http://www.nimblegen.com/technology/manufacture.html>) (upraveno autorem)

Také dobrý výsledek čipů NimbleGen je zajišťován pečlivými testy kvality. Jsou navrženy tak, aby pečovaly o hodnotné vzorky, zajišťovaly vysokou kvalitu čipů a předcházely procesním chybám. [27]

5.4.2 Struktura čipu

Roche NimbleGen produkuje vysokodenzitní čipy (až 390 000 sond/čip) s možností výběru velikosti spotů a délky oligonukleotidů mezi 25 až 70 bazemi, podle toho, jak nejlépe vyhovuje potřebám experimentu. [27]

5.4.3 Pole uplatnění

V nabídce NimbleGen je sekvenační technologie, která umožňuje selektivní vyšetření až 5Mb ve vybraných regionech z celého myšího nebo lidského genomu. Metoda se používá pro souvislé genomické oblasti, celé exony nebo jakékoliv jiné cílové regiony.

CGH analýza porovnává rozdíly mezi referenčním genomem a genomem vzorku. NimbleGen nabízí dva druhy čipů pro CGH produkty. V případě využití celogenomových čipů v rámci CGH analýzy jsou zjišťovány rozdíly v počtu kopií DNA v celé délce genomu, v případě čipů pro vybrané úseky jsou vyhledávány pouze zlomy v cílové oblasti.

Společnost také nabízí čipy pro analýzu exprese genů eukaryotických i prokaryotických organismů. Využívá CGS metodu pro rychlé prozkoumání mikrobiálních genomů, nabízí čipy pro studium methylace DNA a ChIP-on-chip diagnostiku. [27]

6. KOMPARATIVNÍ ANALÝZA

Aby se společnosti úspěšně prosadily na trhu, musí své technologie neustále rozvíjet. Pole možného uplatnění čipových vyšetření se stále rozrůstá, proto začaly společnosti své produkty specializovat do užších oblastí. Tomu přizpůsobily i strukturu čipů. Pole uplatnění jednotlivých platform se překrývají jen z části a porovnat využití jednotlivých čipů není jednoduché. Kompletní přehled produktů společností Affymetrix, Illumina, Agilent Technologies a Roche NimbleGen je uveden v příloze 2.

6.4 VARIABILITA VYUŽITÍ

Čipová vyšetření se dají rozdělit do dvou skupin, té, kde je analyzovaným vzorkem genomová DNA a té, u které je studována RNA. (Tabulka 2)

Při analýze DNA se zjišťuje složení genomu, pořadí jeho sekvencí, ale i jeho poruchy, zejména jednobazové polymorfismy a repetitivní sekvence. Největší nabídkou těchto metod disponuje společnost Affymetrix. Agilent a NimbleGen analyzují genom pomocí komparativní genomové hybridizace. Tato metoda umožňuje zjistit abnormality v počtu kopií genů a chromozomů, pro detekce genových mutací však není dostatečně citlivá. NimbleGen navíc aplikuje podobnou metodu CGS pro posouzení genomů prokaryot.

Pro určování faktorů regulace genové exprese společnosti shodně nabízí čipy pro studium methylace DNA a kromě firmy Illumina také ChIP-on-chip aplikaci.

Dominantním vyšetřením na RNA vzorku je exprese genu. Tyto metody nabízí všechny zmíněné platformy. Některé společnosti v tomto směru navíc umožňují expresi miRNA a Illumina vyvinula technologii, která dokáže určit genovou aktivitu z degradovaných vzorků.

Unikátní technologií je toxikogenomická analýza nabízená firmou Affymetrix, která sleduje vliv toxických látek z vnějšího prostředí na genovou aktivitu. Proto je možné ji využít při plánování léčby resp. aplikaci léků. [20][21][26][27]

		Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
Analýza DNA	Celogenomové genotypování SNP detekce, CNV variace	ano	ano	Ne	ne
	Genotypování cílové oblasti	ano	ne	ne	ne
	Resekvenování	ano	ne	ne	ne
	Methylace DNA	ano	ano	ano	ano
	ChIP-on-chip	ano	ne	ano	ano
	CGH technologie	ne	ne	ano	ano
	CGS technologie	ne	ne	ne	ano
Analýza RNA	Analýza genové exprese	ano	ano	ano	ano
	Exprese microRNA	ne	ano	ano	ne
	DASL exprese genu	ne	ano	ne	ne
	Toxicogenomika	ano	ne	ne	ne

Tabulka 2: Nabídka čipových technologií komerčních platforem

Sledování poruch genomu a vyhledávání transkribovaných genů jsou základními aplikacemi čipových technologií. Čipy každé společnosti však disponují jinými parametry.

6.4.1 Analýza genomu

Illumina vyvinula pro genotypování metodu GoldenGate, se kterou se zapojila i do Human Genome projektu. Infinium technologii lze využít i pro detekci CNV.

GeneChip Mapping Array společnosti Affymetrix umožňuje provádět širokou škálu vazebných analýz, asociací a CNV studií. Tento vysocedenzitní čip, vybavený 40 sondami pro každý SNP, výrazně urychlil celogenomovou analýzu.

Vzhledem k tomu, že GoldenGate a Infinium technologie nejsou technologiemi pracujícími na principu přímé hybridizace, je těžké tyto čipy porovnat. Hlavní rozdíly v parametrech společností jsou v délce sond, kdy Affymetrix používá řetězec o 25 bazích a Illumina o 50 bazích. Rozdíly jsou i v množství spotů a jejich velikosti. Illumina navíc aplikuje dvoubarevné značení. (Tabulka 3)

	Affymetrix	Illumina
Délka sondy	25 bazí	50 bazí
Pokrytí SNPs	40 sond/SNP	GoldenGate technologie
Pokrytí CNV	61 sond/úsek	Infinium technologie
Množství spotů	420000- 946000	1.1 million
Velikost spotů	11µm	3µm beads
Značení	1 vzorek (biotin-streptavidin+Cy3)	2 vzorky (Cy3,Cy5)
Požadované množství vzorku	500ng	200 -750ng

Tabulka 3: Genotypovači čipy (Affymetrix, Illumina)

Agilent a NimbleGen pracují na úrovni analýzy DNA především pomocí CGH technologie. Parametry čipů pro tuto metodu se výrazně neliší. Obě společnosti syntetizují delší sondy a hustota nanesených spotů nepřesahuje 400 000. (Tabulka 4)

	Agilent	NimbleGen
Délka sond	60 bazí	50-75 bazí
Množství spotů	237220	385000 (1-plex format), 72000 (4-plex format array)
Velikost spotu		16µm x 16µm
Velikost čipu	25mm x 76mm	25mm x 76 mm, sklo
Značení	2 vzorky (Cy3 a Cy5)	2 vzorky (Cy3 a Cy5)
Požadované množství vzorku		1 - 3µg izolované gDNA testovaného vzorku 1 - 3µg izolovaného gDNA referenčního vzorku

Tabulka 4: CGH technologie (Agilent, NimbleGen)

6.4.2 Expresní analýza

RNA vzorky se používají zejména pro identifikaci aktivních genů v buňce, tedy genů, které se z DNA transkribují. To je významné například při porovnání transkripční aktivity genů v jednotlivých tkáních u kontrol a pacientů.

K tomu účelu se často uplatňují dvoubarevné čipy, které využívají firmy Agilent a NimbleGen. U čipů firem Affymetrix a Illumina jsou výsledky dvou jednobarevných vzorků porovnávány po provedení hybridizace.

Čip GeneChip Expression Arrays firmy Affymetrix je charakteristický vysokou hustotou nanesených spotů o délce 25 nukleotidů. Tím zajišťuje detekci až 47 000 transkriptů. Expresní čipy společností Agilent Technologies a NimbleGen nedosahují takové hustoty spotů, kompenzují to však délkou sond. Tím se zajišťuje srovnatelné množství analyzovaných transkriptů (Agilent 41 000, NimbleGen 47 000).

Těmto parametrům se naprosto vymyká Illumina, která s přítomností 1500 kuliček umožňuje zjistit 24 000 transkriptů. Nižší hustota nanesených spotů však společnosti umožňuje použít menších objemů vzorků a chemikálií. (Tabulka 5)

	Affymetix	Illumina	Agilent	NimbleGen
Množství analyzovaných transkriptů	Až 47 000	Až 24 000	Až 41 000	Až 47 000
Délka sondy	25 bazí	50 bazí	60 bazí	60 bazí
Počet sond/gen	11 - 20 sond/gen	30 sond/gen		2 - 25 sond/gen
Množství spotů	až 1,3 milionu	1 500 kuliček	237220	385 000 (1-plex format), 72 000 (4-plex format)
Velikost spotů	11µm, 18µm	3µm kuliček		16µm x 16µm
Velikost čipu		26 x 82.5 mm	25mm x 76mm	25mm x 76mm
Značení vzorku	1 vzorek (biotin-streptavidin+Cy3)	1 vzorek (biotin-streptavidin+Cy3)	1 vzorek (Cy3) nebo 2 vzorky (Cy3, Cy5)	1 vzorek (Cy3)
Požadované množství vzorku		50–100 ng celkové RNA		RNA: 20µg - 30µg mRNA: 10µg cDNA: 4µg - 8µg

Tabulka 5: Čipy pro identifikaci expres genu (Affymetrix, Illumina, Agilent, NimbleGen)

6.4.3 Souhrn

Affymetrix má obecně větší množství spotů. Je to dáno tím, že syntetizuje kratší sondy v několika kopiích, což by mělo, oproti čipům ostatních společností, zajistit citlivější hybridizaci. Proto je její hlavní parketou analýza genomu, kdy tato koncepce zajišťuje přesnější výsledky.

Oproti tomu ostatní společnosti s delšími sondami umožňují vyhodnocení většího množství transkribovaných genů na menším množství spotů.

Čipy společnosti Illumina není možné porovnat s ostatními díky jiným prostorovým řešením čipu (kuličky) a často používaným odlišným reakčním technologiím.

6.1 CUSTOM ARRAYS

Možnost vlastního návrhu sond byla ještě donedávna výhodou pracovišť, která vlastnila čipovací přístroj pro přípravu cDNA nebo oligonukleotidových čipů. Tento způsob výroby ovšem s sebou nese mnoho nevýhod, proto dnes jednoznačně převažuje využití komerčně vyráběných čipů.

Všechny komerční platformy nabízejí paletu čipů se standardním složením imobilizovaných sond pro určitá vyšetření. Tato paleta je v současnosti tak rozsáhlá, že snadno uspokojí požadavky experimentů.

I přes to společnosti umožňují vyrobit čip, podle návrhu zákazníka. Tyto čipy, Custom Arrays, jsou dnes běžnou součástí nabídky firem.

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
Oblasti nabídky	genová exprese resekvenování, SNP genotypování	DASL exprese GoldenGate a Infinium genotypování methylace DNA	Expese genu CGH methylace DNA miRNA ChIP-on-chip	CGS CGH, ChIP-on-chip Methylace DNA genová exprese
Délka sond	25 bazí	50 bazí	25 - 60 bazí	25 - 70bazí
Počet sond/gen	11 – 20 sond/gen			2 – 25sond /gen
Velikost spotu	8µm (resekvenování) 11µm, 18µm	3µm (kuličky)		16µm
Počet spotů	až 1,3 milionů	1536 kuliček	10807-243504	
Formát čipu	GeneChip Universal 3K, 5K, 10K, 25K and 70K Arrays (SNP detekce); 49, 100, 169 (resekvenování);	Universal-16 or the Universal-96 Array Matrix	25mm x 76mm, skleněný čip : 1 x 244K, 2 x 105K, 4 x 44K, a 8 x 15K	25mm x 76mm, skleněný čip

Tabulka 6: Nabídka Custom arrays

V nabídce Custom Arrays všech firem jsou expresní čipy a čipy pro analýzu DNA. (Tabulka 6)

Affymetrix navíc umožňuje navrhnout čip pro resekvenování. Illumina pro genotypování poskytuje technologie Infinium a GoldenGate, které navíc aplikuje i na metylaci DNA. Speciální aplikací firmy Illumina je DASL exprese genů, která se využívá pro analýzu degradovaných materiálů (např. FFPE vzorků).

Methylaci DNA prostřednictvím klasické hybridizace k sondám nabízí společnosti Agilent a NimbleGen, které mají v nabídce také CGH custom array a ChIP-on-chip technologii. [20][21][26][27]

6.3 ONE COLOR X TWO COLOR

Jak již bylo uvedeno, na čipu lze hybridizovat jeden nebo dva vzorky zároveň. I v této otázce experimentu zvolily společnosti různé přístupy.

Affymetrix vyrábí výhradně jednobarevné čipy a referenční pozadí zajišťuje přítomností mismatch sond. Obvykle volí nepřímé značení materiálu s využitím biotin-streptavidin, což umožňuje výrazné zvýšení signálu záření.

Illumina volí značení v závislosti na druhu experimentu. Nepřímé značení prostřednictvím biotin-streptavidin systému využívá u čipů pro genovou expresi, naopak u GoldenGate i Infinium technologií se aplikují dva různé barevné vzorky zároveň. (Cy3 a Cy5).

Agilent Technologies pro převážnou část nabízených aplikací hybridizuje dva vzorky proti sobě (CGH, ChIP-on-chip, methylace DNA). U exprese genu nabízí jak jednobarevné, tak dvoubarevné provedení čipu.

NimbleGen produkuje dvoubarevné čipy pro CGH metodu, ChIP-on-chip a metylaci DNA a jednobarevné pro expresní analýzu. [20][21][26][27]

6.2 SPEKTRUM DOSTUPNÝCH ČIPŮ PRO JEDNOTLIVÉ ORGANISMY

Rozsah studovaných organismů každé firmy je jiný, a liší se i mezi typy čipů v rámci jedné společnosti.

Největší škála čipů je produkována pro lidské vzorky. Ty je možné analyzovat u všech možných čipových technologií v několika variantách. Vyplývá to z významného uplatnění DNA čipů v medicíně a farmakologii. [20][21][26][27]

6.2.1 Čipy pro studium prokaryotických organismů

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
Exprese genu	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i> <i>M. grisea</i>	Archea Bacteria
ChIP-on-chip				<i>E. coli</i>
CGS technologie				Mikroorganismy (Custom array)

Tabulka 7: Spektrum čipů pro studium prokaryotických organismů

Čipová vyšetření prokaryotických organismů nejsou příliš rozsáhlá. V podstatě se omezuje na expresi genů několika bakterií, zejména *E. coli* - pro ni nabízí firma NimbleGen také ChIP-on-chip technologii. Tato společnost navíc nabízí srovnávací genotypovací analýzu vybraných mikrobů. (Tabulka 7)

Úspěšná analýza umožňuje určit rod patogenů při infekci nebo identifikovat geny zodpovědné za rezistenci na antibiotika. Naopak díky znalosti genů aktivních v průběhu infekce lze vyvinout nová antibiotika, která působí pouze na konkrétní geny bakterie. Studium prokaryotických organismů se uplatňuje také v potravinářském

průmyslu, farmacii, a ekologii, kdy se sleduje adaptace genomu organismů v závislosti na změny životního prostředí.

6.2.2 Čipy pro studium eukaryotických organismů

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
CGH				Pivní kvasinka (<i>S. cerevisiae</i>) <i>S. pombe</i>
ChIP-on-chip	Huseníček (<i>Arabidopsis</i>) Pivní kvasinka (<i>S. cerevisiae</i>) <i>S. pombe</i>		Huseníček (<i>Arabidopsis</i>) <i>S. pombe</i>	Huseníček (<i>Arabidopsis</i>) Pivní kvasinka (<i>S. cerevisiae</i>)
Studium methylace DNA	Huseníček (<i>Arabidopsis</i>) Pivní kvasinka (<i>S. cerevisiae</i>) <i>S. pombe</i>			Huseníček (<i>Arabidopsis</i>)
Detekce exprese genu	Huseníček (<i>Arabidopsis</i>) Ječmen (<i>Hordeum</i>) Citrus (<i>Citrus</i>) Bavlník (<i>Gossypium</i>) Kukuřice (<i>Zea</i>) Topol (<i>Populus</i>) Rýže (<i>Oryza</i>) Soja (<i>Glycine max</i>), Cukrová třtina (<i>Saccharum officinarum</i>) Rajče (<i>Solanum lycopersicum</i>) Pšenice (<i>Triticum</i>)		Rýže (<i>Oryza</i>)	Huseníček (<i>Arabidopsis</i>) Pivní kvasinka (<i>S. cerevisiae</i>) <i>S. pombe</i>

Tabulka 8: Spektrum čipů pro studium hub a rostlin

I pro mnohobuněčné organismy je na trhu řada čipových aplikací. Kromě firmy Illumina, která se omezuje na studium myši a potkanů, mají společnosti čipy pro několik druhů rostlin a živočichů.

Často analyzovanou rostlinou je *Arabidopsis*. Tento nenápadný plevel se z důvodů své nenáročnosti a krátké doby života jedné generace hodí jako modelový organismus pro genetický výzkum. V roce 2000 se tak stal první rostlinou, jejíž genom byl kompletně osekvenován. Hlavní pozornost se věnovala funkcím jeho (celkem asi 25 500) genů, z nichž dosud experimentálně byla studována funkce asi jen 3 000 z nich. Genom *Arabidopsis* poskytl základní mapu hodnotných genů, které slouží jako předloha pro výzkum podobných genů jiných rostlin. Například se podařilo objevit gen ovlivňující velikost rostliny, který byl využit u rýže. Nejširší nabídkou čipů v rostlinné říši disponuje Affymetrix. (Tabulka 8)[13]

Výzkum organismů, jako jsou mouchy, červi nebo potkani, přináší řadu podstatných informací o živočiších. Při studiu lidského genomu je myš nebo potkan vhodným modelovým organismem, proto jsou v nabídce všech zmíněných firem.

Analýzu exprese genů společnosti uplatňují i na další živočišné druhy, Affymetrix navíc nabízí čipy i pro zjišťování regulace genové exprese myši a potkanů, zatímco Agilent umožňuje jejich microRNA analýzu. (Tabulka 9)

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
CGH			Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>) Kur domácí (<i>Gallus gallus</i>)	Hádátka obecné (<i>C. elegans</i>) Tur domácí (<i>Bos taurus</i>) Pes (<i>Canis</i>) Danio pruhové (<i>Danio rerio</i>) Octomilka (<i>Drosophila</i>) Kur domácí (<i>Gallus gallus</i>) Makak (<i>Macaca mulatta</i>) Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Žimnička (<i>Plasmodium</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)
Studium methyla- ce DNA	Octomilka (<i>Drosophila</i>) Hádátka obecné (<i>C. elegans</i>) Myš domácí (<i>Mus musculus</i>)		Myš domácí (<i>Mus musculus</i>)	Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>) Pes (<i>Canis</i>) Kur domácí (<i>Gallus gallus</i>)
ChIP-on- chip	Octomilka (<i>Drosophila</i>) Hádátka obecné (<i>C. elegans</i>)		Octomilka (<i>Drosophila</i>) Kvasinka (<i>Saccharomyces</i>) Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Hádátka obecné (<i>C. elegans</i>)	Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>) Pes (<i>Canis</i>) Octomilka (<i>Drosophila</i>) Kur domácí (<i>Gallus gallus</i>) Hádátka obecné (<i>C. elegans</i>)
Detekce expres genu	Tur domácí (<i>Bos taurus</i>) Pes (<i>Canis</i>) Kur domácí (<i>Gallus gallus</i>) Octomilka (<i>Drosophila</i>) Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Žimnička (<i>Plasmodium</i>) Prase (<i>Sus</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>) Makak (<i>Macaca mulatta</i>) Drápatka (<i>Xenopus</i>) Kvasinka (<i>Saccharomyces</i>) Zebrafish	Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)	Hádátka obecné (<i>C. elegans</i>) Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>) Tur domácí (<i>Bos taurus</i>) Kur domácí (<i>Gallus gallus</i>) Pes (<i>Canis</i>) Žába (<i>Anura</i>) Octomilka (<i>Drosophila</i>) Prase (<i>Sus</i>) Makak (<i>Macaca mulatta</i>) Ovce (<i>Ovis</i>) Kvasinka (<i>Saccharomyces</i>) Zebrafish	Hádátka obecné (<i>C. elegans</i>) Octomilka (<i>Drosophila</i>) Danio pruhové (<i>Danio rerio</i>) Myš domácí (<i>Mus musculus</i>) Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)

Tabulka 9: Spektrum čipů pro studium živočichů. V tabulce není zahrnut lidský materiál, vzhledem k tomu, že společnosti pro ně produkují všechny uvedené technologie v několika variantách.

6.2.3 Souhrn

DNAčipy se nejvíce uplatňují při genetické analýze člověka, myši a potkana. Studium ostatních eukaryot a prokaryot se uplatňuje zejména v oblasti genové exprese, kde některé společnosti umožňují analýzu více než dvaceti druhů, zejména živočichů. Naopak u genotypovacích čipů není rozsah nijak výrazný. Pouze společnost NimbleGen

uplatňuje CGH metodu na několik druhů eukaryot a CGS metodu na prokaryotické organismy.

7. ZÁVĚR

Čipové technologie jsou moderní diagnostické metody, vyvíjející se během posledního desetiletí. Za jejich rozmach se zasloužila zejména sériová výroba oligonukleotidových čipů.

S úměrně se snižující cenou těchto komerčně vyráběných čipů klesá využití přístrojů pro přípravu cDNA čipů v laboratořích.

Platformou zabývajících se syntézou čipů je celá řada, světovému trhu ovšem dominují společnosti Affymetrix, Illumina, Agilent Technologies a Roche NimbleGen.

Přístup k syntéze sond na povrch čipů každé z nich se liší, všechny však uplatňují „in situ“ metodu. Výsledkem jsou čipy s uniformní délkou sond, za jejichž kvalitu ručí řada kontrolních procesů.

Díky rozsáhlému spektru uplatnění zasahují DNA čipy do řady oblastí vědy, od medicíny až po environmentalistiku. Je to dáno i množstvím studovaných organismů, prokaryot i eukaryot, ačkoliv studium lidského genetického materiálu převažuje.

Čipy se liší v několika podstatných parametrech. Jsou to zejména délka sondy a hustota jejich nanesení. To určuje množství výsledků a rychlost celkové analýzy, která se často kvůli objemnému materiálu provádí na několika vzájemně se doplňujících čipech. Kromě všech těchto rozdílů je jejich srovnání složité i z toho důvodu, že pole uplatnění společností se překrývají jen z části a struktury čipů jsou obvykle přizpůsobené konkrétnímu experimentu.

ZDROJE

Použitá Literatura

- [1] Amaratunga D., Cabrera J.: Exploration and analysis of DNA microarray and protein data. Hoboken : John Wiley, 2004. 246 s. ISBN 0-471-27398
- [2] Bouchal J., Turashvili G., Kolář Z.: Mikročipová analýza genové exprese v mikrodisekovaných vzorcích. Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 360-364
- [3] Brdlička R., Bruchová H.: Vznik a rozmach čipových technologií. Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 331-332
- [4] Dziechciarková M., Berkovcová J., Trojanec R., Srovnal P., Bouchalová K., Hajdúch M.: Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz, Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 355-360
- [5] Gojová L., Kozák L.: Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění, Klin. Biochem. Metab., 14 (35), 2006, No. 2, p. 89–95.
- [6] Ing. Kmoch, S. CSc., Nové technologie v analýze DNA, RNA a proteinů, textová verze přednášky, <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylabus-predmetu.htm>
- [7] Jarošová M., Pospíšilová H., Plachý R., Papajík T., Koptíková J., Indrák K.: Určování nebalancovaných genových změn metodou array komparativní genomové hybridizace (array CGH) u nádorů, Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 342-346
- [8] Merkerová M., Kráčmerová A., Bruchová H., Brdlička R.: Využití biočipových technologií v onkologii, Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 333-338
- [9] Svoboda M., Michálek J.: Úvod do technologie DNA čipů, Lékař a technika. ISSN 0301-5491, 2004, vol. 33, no. 3, pp. 67-75
- [10] Tichý, B., Svoboda, M., Mayer J., Pospíšilová Š.: Odběr a zpracování vzorků pro DNA čipy, Klinická Onkologie. ISSN 0862-495 X, 2006, vol. 19, suppl. Prosinec, pp. 350-355

- [11] Vladimír Vinarský, Porovnání nových metod sekvenace bakteriálních genomů s metodou klasickou, Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Masarykovy university, Brno 2006

Internetové zdroje

- [12] <http://akademon.cz/source/genom.htm>
[13] <http://botany.cz/cs/arabidopsis-thaliana/>
[14] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/SUAAV.htm>
[15] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Gen>
[16] http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray
[17] http://en.wikipedia.org/wiki/James_D._Watson
[18] <http://natura.baf.cz/natura/2004/12/20041201.html>
[19] <http://web.telecom.cz/dotdiag/dokument/patobio/genom.pdf>
[20] <http://www.affymetrix.com/>
[21] <http://www.agilent.com/>
[22] <http://www.biology.estranky.cz/clanky/genetika/geneticke-pojmy>
[23] <http://www.gene-chips.com/>
[24] <http://www.genome.gov/20019523>.
[25] <http://www.genscan.com/cz/analyza-dna>
[26] <http://www.illumina.com/>
[27] <http://www.nimblegen.com/>
[28] <http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1090>
[29] <http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/>
[30] <http://www.technologyreview.com/Biotech/12525/>
[31] <http://zdravotnickenoviny.cz/scripts/detail.php?id=146702>
[32] www.nanogen.com

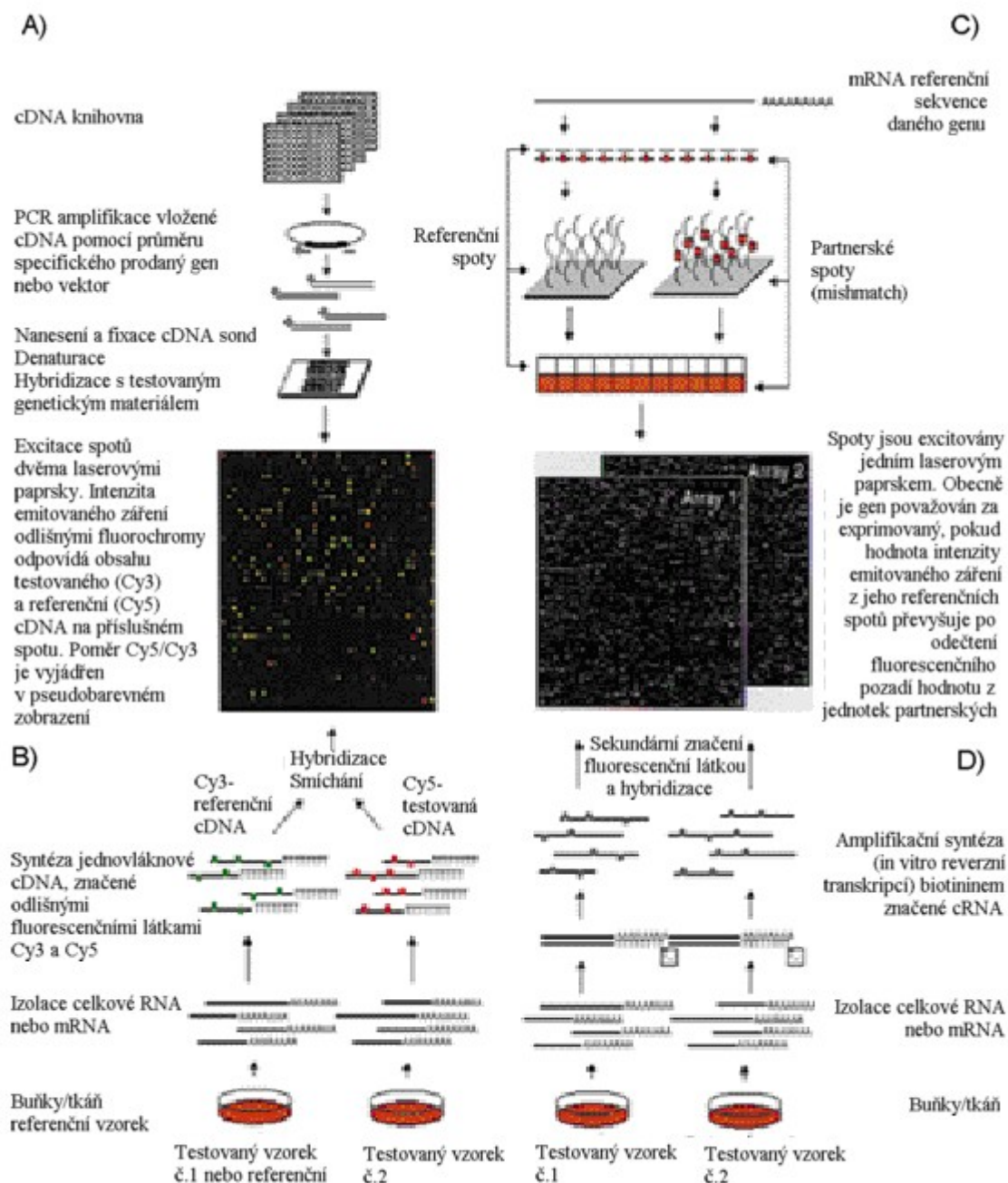
PŘÍLOHY

Příloha 1. Schématický přehled přípravy sond a testovaného materiálu pro cDNA a oDNA

Příloha 2. Přehled produktů komerčních platforem

Příloha 1.

Schématický přehled přípravy sond a testovaného materiálu pro cDNA a oDNA



Příloha 2.

Přehled produktů komerčních platforem

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
Genomové mapování (identifikace SNP)	Genome-Wide Human SNP Array 6.0 Genome-Wide Human SNP Array 5.0 Mapping 500K Array Set Mapping 100K Set Mapping 10K 2.0 Array	Human1M-duo Human1M Human650Y Human610-quad Humanhap550-duo Humanhap550 Humanhap550+ Humanexon510S-duo Humancnv370-quad Humancnv370-duo Humanhap300-duo+ Humanhap300-duo Humanhap240S		
CVN identifikace	Mapping 500K Array Set Mapping 100K Set Mapping 10K 2.0 Array	Human1M HumanCNV370-Duo		
genotypování cílového fragmentu	Application-Fixed Assays Custom SNP Kits	African american Admixture panel BovineSNP50 beadchip Cancer snp panel CanineSNP20 beadchip HumanCVD beadchip DNA test panel Mhc panel set GoldenGate custom panels Iselect custom panels		
resekvenování	Human Mitochondrial Resequencing Array SARS Resequencing Array CustomSeq® Resequencing Arrays			
CGS technologie				Custom NimbleGen CGS Array

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
CGH technologie			Human Genome 244A Human Genome 105A Human Genome 44K Mouse Genome 244A Mouse Genome 105A Mouse Genome 44K Rat Genome 244A Rat Genome 105A Chicken Genome 244A Custom High-Definition CGH	CGH Whole-Genome Tiling Array - Bos taurus - Caenorhabditis elegans - Canis familiaris - Danio rerio - Drosophila melanogaster - Gallus gallus - Homo sapiens (Chromosome-Specific Tiling Set) - Homo sapiens (Whole-Genome Tiling Set) - Homo sapiens (4-Array + 8 Array Whole-Genome Tiling Set) - Macaca mulatta - Mus musculus (Whole-Genome Tiling Set) - Mus musculus (4-Array + 8-Array Whole-Genome Tiling Set) - Plasmodium falciparum 3D7 - Rattus norvegicus - Saccharomyces cerevisiae - Schizosaccharomyces pombe
methy lace DNA	Arabidopsis Tiling 1.0R Array C.elegans Tiling 1.0R Array Chromosome 21/22 1.0 Array Set Chromosome 21/22 2.0R Array Drosophila Genome Arrays + ENCODE01 1.0 Array Human Genome Arrays + Mouse Genome Arrays + S. cerevisiae Tiling 1.0R Array S. pombe Tiling 1.0FR Array	Infinium methylation Goldengate methylation - Cancer panel I - Custom methylation Methylation testimonials	Human CpG Island Human Promoter Mouse CpG Island Mouse Promoter Custom Tiling	DNA Methylation Promoter Tiling Array - Arabidopsis thaliana - Homo sapiens - Mus musculus - Rattus norvegicus DNA Methylation CpG Island-Plus-Promoter Tiling Array - Homo sapiens - Mus musculus DNA Methylation Whole-Genome Tiling Array - Arabidopsis thaliana - Canis familiaris - Gallus gallus - Homo sapiens ENCODE - Homo sapiens - Mus musculus - Rattus norvegicus

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
analýza genové exprese	B. subtilis Genome Array E. coli Genome Arrays + P. aeruginosa Genome Array S. aureus Genome Array Arabidopsis Genome Arrays + Barley Genome Array Bovine Genome Array C. elegans Genome Array Canine Genome 2.0 Array Chicken Genome Array Citrus Genome Array Cotton Genome Array CustomExpress® Array Program Drosophila Genome Arrays + Human Genome Arrays + Maize Genome Array Medicago Genome Array Mouse Genome Arrays + Plasmodium/Anopheles Genome Array Poplar Genome Array Porcine Genome Array Rat Genome Arrays + Rhesus Macaque Genome Array Rice Genome Array Soybean Genome Array Sugar Cane Genome Array Test3 Array Tomato Genome Array Vitis vinifera (Grape) Array Wheat Genome Array Xenopus tropicalis Genome Array Xenopus laevis Genome Arrays Yeast Genome Arrays Zebrafish Genome Array	HumanWG-6 v3 Expression BeadChip HumanRef-8 v3 Expression BeadChip MouseWG-6 v2 Expression BeadChip MouseRef-8 v2 Expression BeadChip RatRef-12 Expression BeadChip	Human Genome, Whole Mouse Development Mouse Genome, Whole Rat Genome, Whole Arabidopsis 3 Bovine C. elegans (V2) Canine Chicken Drosophila E. coli Frog M. grisea 2 Porcine Rhesus Monkey Rice Sheep Yeast (V2) Zebrafish (V2)	- Arabidopsis thaliana (1-plex and 4-plex arrays) - Caenorhabditis elegans (1-plex and 4-plex arrays) - Drosophila melanogaster (1-plex and 4-plex arrays) - Danio rerio (1-plex arrays) - Homo sapiens (1-plex and 4-plex arrays) - Mus musculus (1-plex and 4-plex arrays) - Rattus norvegicus (1-plex and 4-plex arrays) - Saccharomyces cerevisiae (1-plex and 4-plex arrays) - Schizosaccharomyces pombe (1-plex and 4-plex arrays) - Archaea (1-plex arrays) - Bacteria (1-plex arrays)
regulece genové exprese	Human Genome Arrays + Mouse Genome Arrays + Rat Genome Arrays +			

	Affymetrix	Illumina	Agilent	NimbleGen
ChIP-on-chip	Arabidopsis Tiling 1.0R Array C.elegans Tiling 1.0R Array Chromosome 21/22 1.0 Array Set Chromosome 21/22 2.0R Array Drosophila Genome Arrays + ENCODE01 1.0 Array Human Genome Arrays + Mouse Genome Arrays + S. cerevisiae Tiling 1.0R Array S. pombe Tiling 1.0FR Array		Arabidopsis Whole Genome C. elegans Whole Genome Drosophila Whole Genome Human ENCODE Human Promoter Mouse Promoter S. pombe Whole Genome Yeast Whole Genome Custom Tiling	ChIP Promoter Tiling Array - Arabidopsis thaliana - Homo sapiens - Mus musculus - Rattus norvegicus ChIP Whole-Genome Tiling Array - Arabidopsis thaliana - Caenorhabditis elegans - Canis familiaris - Drosophila melanogaster - Escherichia coli - Gallus gallus - Homo sapiens ENCODE - Homo sapiens - Mus musculus - Rattus norvegicus - Saccharomyces cerevisiae
microRNA expresse		Universal Array Matrix for MicroRNA Expression Profiling	Human miRNA (V2) Mouse miRNA Rat miRNA	
DASL genová expresse		Human cancer panel Custom dasl panel		